



# **Universidad Nacional Mayor de San Marcos**

**Universidad del Perú. Decana de América**

**Facultad de Farmacia y Bioquímica**

**Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica**

## **Prevalencia de genes blaOXA-23-like, blaOXA-24-like y blaOXA-58-like en cepas de Acinetobacter baumannii resistentes a carbapenémicos de un Hospital Nacional de Referencia en Lima durante diciembre 2017 – marzo 2018**

### **TESIS**

Para optar el Título Profesional de Químico Farmacéutico

### **AUTORES**

Gianella Delia CASAS MOYA

Klauss Fredy CASTILLO PARDO

### **ASESORES**

Dra. María Elena SALAZAR SALVATIERRA

Lic. Roky Giovanni CHAMPI MERINO

Lima, Perú

2019



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

## Referencia bibliográfica

---

Casas G., Castillo, K. Prevalencia de genes blaOXA-23-like, blaOXA-24-like y blaOXA- 58-like en cepas de *Acinetobacter baumannii* resistentes a carbapenémicos de un Hospital Nacional de Referencia en Lima durante diciembre 2017 – marzo 2018 [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica; 2019.

---



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**  
Universidad del Perú. Decana de América  
**Facultad de Farmacia y Bioquímica**  
**Decanato**



**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS**

Los Miembros del Jurado Examinador y Calificador de la Tesis titulada:

**Prevalencia de genes bla<sub>OXA-23-like</sub>, bla<sub>OXA-24-like</sub> y bla<sub>OXA-58-like</sub> en cepas de *Acinetobacter baumannii* resistentes a carbapenémicos de un Hospital Nacional de Referencia en Lima durante diciembre 2017 – marzo 2018**

Que presentan las Bachilleres en Farmacia y Bioquímica:

**GIANELLA DELIA CASAS MOYA Y  
KLAUSS FREDY CASTILLO PARDO**

Que reunidos en la fecha se llevó a cabo la **SUSTENTACIÓN** de la **TESIS**, y después de las respuestas satisfactorias a las preguntas y objeciones formuladas por el Jurado, y practicada la votación han obtenido la siguiente calificación:

DIECINUEVE (19)

en conformidad con el Art. 34.º del Reglamento para la obtención del Grado Académico de Bachiller en Farmacia y Bioquímica y Título Profesional de Químico Farmacéutico(a) de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Lima, 25 de enero de 2019.

Dra. Mirtha Roque Alcarraz  
Presidente

Mg. Carmen Gladys Peña Suasnabar  
Miembro

Mg. Luis Alberto Rojas Ríos  
Miembro

Mg. Francisco Javier Maria Ramirez Cruz  
Miembro

**"FARMACIA ES LA PROFESIÓN DEL MEDICAMENTO, DEL ALIMENTO Y DEL TÓXICO"**

Puno N° 1002, Jardín Botánico – Lima 1 – Perú  
teléfonos: (511) 328-4737 / (511) 679-7000 anexo 4826 Ap. Postal 4559 – Lima 1  
mail: decanofyb@unmsm.edu.pe <http://farmacia.unmsm.edu.pe>



## **DEDICATORIA**

A Dios, por darme vida y salud, por protegerme en mi camino y darme las fuerzas necesarias para cumplir cada objetivo en mi vida.

A mis padres, que siempre confiaron en mí, y me brindaron siempre su apoyo incondicional, enseñándome con el ejemplo a nunca desistir de mis sueños, siendo un soporte en mi vida, les agradezco todo lo que hicieron y hacen por mí, este logro es para ustedes.

A mis hermanos, que siempre estuvieron y están cuando los necesito que son mis cómplices en mis diferentes aventuras, gracias por apoyarme en cada etapa de mi vida y ser mis mejores amigos, siempre estaremos juntos y este logro les pertenece.

A una persona muy especial, que siempre estuvo conmigo en mis diferentes momentos, que saca lo mejor de mí, y me alienta a cumplir mis metas.

Muchas gracias por todo.

Los amo con todo mi ser.

**Gianella Delia Casas Moya**

## **DEDICATORIA**

A dios, quien como guía estuvo presente en el caminar de mi vida, bendiciéndome y dándome fuerzas para continuar con mis metas trazadas. Gracias por permitirme vivir este momento tan especial en mi vida de mi formación profesional.

A mi madre Natividad por ser el pilar en mi vida, por los ejemplos de perseverancia y constancia que la caracterizan y que me ha infundado siempre, por el valor mostrado para salir adelante y por su amor. Por su gran apoyo, consejos, comprensión y ayuda en los momentos difíciles. Gracias a sus esfuerzos es responsable de quién soy hoy.

A mi familia por su continuo aliento en este caminar, creer en mí y ser la motivación para cada día llegar más lejos en mi vida y mi carrera profesional.

**Klauss Fredy Castillo Pardo**

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios, por habernos permitido llegar hasta este punto y darnos salud para lograr nuestros objetivos, además de su infinita acción de bondad y amor.

A nuestros maestros quienes nunca desistieron al enseñarnos, a pesar de las circunstancias, a ellos que continuaron depositando sus esperanzas en nosotros.

A todos los que nos apoyaron para concluir esta tesis en especial a la Dra. María Elena Salazar Salvatierra y al Lic. Roky Giovanni Champi Merino a quienes agradecemos de todo corazón por su apoyo incondicional y confianza en nosotros. Toda nuestra gratitud y respeto hacia ustedes.

## ÍNDICE

Índice de tablas	VII
Índice de figuras	VIII
Acrónimos y abreviaturas	X
Resumen	XI
Summary	XII
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Objetivo general	3
1.2 Objetivos específicos	3
II. GENERALIDADES	4
2.1 Antecedentes generales	4
2.2 Marco teórico	15
2.2.1 <i>Acinetobacter baumannii</i>	15
2.2.2 Importancia clínica	16
2.2.2.1 Infecciones con <i>Acinetobacter baumannii</i>	19
2.2.3 Resistencia del <i>Acinetobacter baumannii</i>	22
2.2.3.1 Factores de virulencia	22
2.2.3.2 Mecanismos de resistencia	26
2.2.4 Elementos genéticos móviles relacionados con la resistencia a carbapenémicos en <i>Acinetobacter             baumannii</i>	35



III. PARTE EXPERIMENTAL	38
3.1 Materiales, reactivos y equipos	38
3.1.1 Materiales	38
3.1.2 Reactivos	39
3.1.3 Equipos	40
3.1.4 Otros	41
3.2 Recolección y preservación de muestras	42
3.2.1 Reactivación e identificación de muestras	42
3.2.2 Susceptibilidad antimicrobiana	45
3.3 Detección fenotípica	45
3.3.1 Método de inactivación de las carbapenemasas (MIC*)	45
3.4 Detección genotípica	46
3.4.1 Extracción del ADN genómico	46
3.4.2 Detección de la presencia de genes	47
3.4.3 Análisis de resultados	49
3.5 Aspectos éticos	49
IV. RESULTADOS	51
4.1 Origen de las cepas recolectadas	51
4.2 Detección fenotípica	51
4.3 Detección genotípica	54
V. DISCUSIÓN	59
VI. CONCLUSIONES	64
VII. RECOMENDACIONES	65
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
IX. ANEXOS	82

## ÍNDICE DE TABLAS

- Tabla 1. Listado de los microorganismos del grupo ESKAPE.
- Tabla 2. Cuadro resumen de los mecanismos de resistencia *Acinetobacter baumannii*.
- Tabla 3. Secuencia de los cebadores para la detección de OXA en *Acinetobacter baumannii*, en la prueba de PCR múltiplex y el tamaño del producto de amplificación.
- Tabla 4. Mezcla de reacción (Mix PCR)
- Tabla 5. Detección fenotípica de carbapenemasas en 51 cepas de *Acinetobacter baumannii*.
- Tabla 6. Detección molecular por PCR multiplex del bla<sub>OXA-23-like</sub>, bla<sub>OXA-24-like</sub> y bla<sub>OXA-58-like</sub> en cepas de *Acinetobacter baumannii* a nivel genómico.
- Tabla 7. Prevalencia del bla<sub>OXA-23-like</sub>, bla<sub>OXA-24-like</sub> y bla<sub>OXA-58-like</sub> en cepas de *Acinetobacter baumannii* a nivel genómico.
- Tabla 8. Perfil de susceptibilidad de las cepas *Acinetobacter baumannii* - CLSI 2018.

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Mecanismos responsables de la resistencia a carbapenémicos del *Acinetobacter baumannii*
- Figura 2. Carbapenemasas clínicamente relevantes en *Acinetobacter baumannii*.
- Figura 3. Mecanismo de acción de las  $\beta$ -lactamasas
- Figura 4. A. Bomba de expulsión de la superfamilia MFS. B. Bomba de expulsión de la familia MATE. C. Bombas de expulsión de la familia RND. ATB: Antibiótico. Los distintos antimicrobianos son expulsados desde el interior celular mediante un mecanismo de antiporte en relación con los protones.
- Figura 5. Diagrama de flujo de la parte experimental de la detección fenotípica y genotípica en cepas de *Acinetobacter baumannii* resistentes a carbapenémicos.
- Figura 6. Prueba MIC\*: Control positivo (cepa de *Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa positivo) con ausencia de una zona de inhibición que indica hidrólisis enzimática del meropenem; y control negativo (cepa de *Acinetobacter baumannii* carbapenemasa negativo) con presencia de una zona de inhibición debida a la ausencia de carbapenemasas.
- Figura 7. Prueba MIC\*. M-B: Muestra blanco (disco de meropenem sin prueba MIC\*). M-1 y M-2: Cepas productoras de carbapenemasas.
- Figura 8. Prueba MIC\*. M-3, M-4, M-5 y M-6: Cepas productoras de carbapenemasas.
- Figura 9. Distribución porcentual del bla<sub>OXA-23-like</sub>, bla<sub>OXA-24-like</sub> y bla<sub>OXA-58-like</sub> en cepas de *Acinetobacter baumannii* a nivel genómico.

- Figura 10. Prevalencia del bla<sub>OXA</sub>-23-like, bla<sub>OXA</sub>-24-like y bla<sub>OXA</sub>- 58-like en cepas de *Acinetobacter baumannii* a nivel genómico.
- Figura 11. Electroforesis de PCR multiplex para los genes bla<sub>OXA</sub>-23-like, bla<sub>OXA</sub>-24-like y bla<sub>OXA</sub>- 58-like en cepas de *Acinetobacter baumannii*. C: Control negativo. B: Blanco. Muestra 11: Cepa negativa. L1: Ladder de 1kb.
- Figura 12. Electroforesis de PCR multiplex para los genes bla<sub>OXA</sub>-23-like, bla<sub>OXA</sub>-24-like y bla<sub>OXA</sub>- 58-like en cepas de *Acinetobacter baumannii*. Muestras 49 y 50: Cepas positivas para los genes bla<sub>OXA</sub>- 58-like y bla<sub>OXA</sub>-24-like. Muestras 48 y 51: Cepas positivas para el gen bla<sub>OXA</sub>-24-like. L2: Ladder de 100 bp.
- Figura 13. Electroforesis de PCR multiplex para los genes bla<sub>OXA</sub>-23-like, bla<sub>OXA</sub>-24-like y bla<sub>OXA</sub>- 58-like en cepas de *Acinetobacter baumannii*. Muestras 26, 27, 30, 31 y 33: Cepas positivas para el gen bla<sub>OXA</sub>-24-like. Muestras 28, 29, 32 y 34: Cepas negativas para los genes en estudio. L2: Ladder de 100 bp.
- Figura 14. Prueba de la Oxidasa - BactiDrop™ Oxidase.
- Figura 15. Distribución porcentual de las 51 cepas recolectadas de *Acinetobacter baumannii* según áreas del Hospital Nacional de Referencia.
- Figura 16. Distribución porcentual de las 51 cepas recolectadas de *Acinetobacter baumannii* según tipo de muestra.

## ACRÓNIMOS Y ABREVIATURAS

OMS:	Organización Mundial de la Salud.
OPS:	Organización Panamericana de la Salud.
UCI:	Unidad de cuidados intensivos.
UCIN:	Unidad de cuidados intermedios
UCI-NEO:	UCI neonatal.
PDR:	Polimixinas.
CRAB:	<i>Acinetobacter baumannii</i> resistente a carbapenémicos.
NSAR:	National Surveillance of Antimicrobial Resistance.
NARST:	The National Antimicrobial Resistance Surveillance Center.
ARSP:	Antimicrobial Resistance Surveillance Program
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa
ADN:	Ácido desoxirribonucleico
ST2:	Secuencia tipo 2.
OXA:	Oxacilinas
IDSA:	Sociedad Americana de Enfermedades Infecciosas
ITU:	Infección del tracto urinario.
ABC:	<i>ATP-binding cassette</i>
MFS:	<i>Major Facilitator Superfamily.</i>
RND:	<i>Resistance-nodulation-cell division</i>
MATE :	<i>Multidrug and toxic compound extrusion</i>
SMR:	<i>Small Multidrug Resistance.</i>
CIM:	Concentración inhibidora mínima.
IS:	Inserción bacteriana.
MIC*:	Método de inactivación de los carbapenémicos.

## RESUMEN

El presente estudio tiene como objetivo identificar y determinar la prevalencia de los genes bla<sub>OXA</sub>-23-like, bla<sub>OXA</sub>-24-like y bla<sub>OXA</sub>-58-like, que codifican las carbapenemasas de tipo OXA, las cuales son consideradas clínicamente relevantes en el *Acinetobacter baumannii*. Se analizaron 51 aislamientos de *Acinetobacter baumannii* con perfil de resistencia a carbapenémicos provenientes del Laboratorio Clínico de un Hospital Nacional de Referencia en Lima de diciembre 2017 – marzo 2018. Se determinó fenotípicamente la presencia de carbapenemasas por el método de inactivación de los carbapenémicos seguido de la identificación genotípica de los genes del tipo OXA de mayor importancia clínica la cual se realizó por PCR multiplex los genes bla<sub>OXA</sub>-23-like, bla<sub>OXA</sub>-24-like y bla<sub>OXA</sub>-58-like. Se obtuvieron fenotípicamente 51/51 (100%) pruebas positivas para la presencia de carbapenemasas en las cuales se identificaron genéticamente la presencia de 38/51 (74,5%) bla<sub>OXA</sub>-24-like y 5/51 (9,8%) bla<sub>OXA</sub>-58-like. Un solo gen en 33/51 (64,7%) cepas corresponden a bla<sub>OXA</sub>-24-like y 2 genes en 5/51 (9,8%) cepas corresponden a bla<sub>OXA</sub>-24-like y bla<sub>OXA</sub>-58-like; no se detectó la presencia de genes codificantes bla<sub>OXA</sub>-23-like. Se concluye que el 100% de las cepas recolectadas, evaluadas a través del método MIC\*, son productoras de enzimas carbapenemasas; así mismo el 38/51 (74,5%) de estas cepas portaban genes codificantes de bla<sub>OXA</sub>-24-like y bla<sub>OXA</sub>-58-like siendo el gen bla<sub>OXA</sub>-24-like el más prevalente. Finalmente en el presente estudio no se detectó la presencia de genes codificantes bla<sub>OXA</sub>-23-like.

Palabras clave: *Acinetobacter baumannii*, carbapenemasas, OXA, bla<sub>OXA</sub>-23-like, bla<sub>OXA</sub>-24-like, bla<sub>OXA</sub>-58-like.

## SUMMARY

The present study aims to identify and determine the prevalence of genes *bla*<sub>OXA-23-like</sub>, *bla*<sub>OXA-24-like</sub> and *bla*<sub>OXA-58-like</sub>, which encode OXA-type carbapenemases, which are considered clinically relevant in *Acinetobacter baumannii*. 51 isolates of *Acinetobacter baumannii* with carbapenemic resistance profile were analyzed from the Clinical Laboratory of a National Reference Hospital in Lima from December 2017 - March 2018. The presence of carbapenemase was phenotypically determined by the method of inactivation of carbapenems followed by the genotypic identification and the prevalence of genes of the OXA type of greater clinical importance which was performed by amplifying by multiplex PCR *bla*<sub>OXA-23-like</sub>, *bla*<sub>OXA-24-like</sub> and *bla*<sub>OXA-58-like</sub> genes. 51/51 (100%) phenotypically positive tests were obtained for the presence of carbapenemases in which the presence of 38/51 (74.5%) *bla*<sub>OXA-24-like</sub> and 5/51 (9.8%) were genetically identified *bla*<sub>OXA-58-like</sub>. A single gene in 33/51 (64.7%) strains correspond to *bla*<sub>OXA-24-like</sub> and 2 genes in 5/51 (9.8%) strains correspond to *bla*<sub>OXA-24-like</sub> and *bla*<sub>OXA-58-like</sub>; the presence of *bla*<sub>OXA-23-like</sub> genes was not detected. It is concluded that 100% of the strains collected, evaluated through the MIC\* method, are producers of carbapenemase enzymes; likewise, 38/51 (74.5%) of these strains carried genes encoding *bla*<sub>OXA-24-like</sub> and *bla*<sub>OXA-58-like</sub>, with the *bla*<sub>OXA-24-like</sub> gene being the most prevalent. Finally, in the present study, the presence of genes encoding *bla*<sub>OXA-23-like</sub> was not detected.

**Key words:** *Acinetobacter baumannii*, carbapenemases, OXA, *bla*<sub>OXA-23-like</sub>, *bla*<sub>OXA-24-like</sub>, *bla*<sub>OXA-58-like</sub>.

## I. INTRODUCCIÓN

La resistencia a los antibióticos es un problema de salud pública mundial y a su vez una amenaza para la salud humana y animal; por lo que se requiere controlarlo afín de evitar consecuencias sociales, económicas y de seguridad sanitaria. El alto nivel de resistencia a los antibióticos registrado hoy en día en el mundo es consecuencia del abuso y mal uso de los antibióticos, así el aumento de la frecuencia y uso de los viajes internacionales de personas infectadas por patógenos resistentes pueden contribuir a la propagación de la resistencia a los antibióticos<sup>1</sup>.

La Organización Mundial de la Salud (OMS), la Organización Panamericana de la Salud (OPS) y los Ministerios de Salud de las distintas naciones, han declarado esta situación como un problema grave y podría ser considerada como una infección emergente<sup>2</sup>.

Entre los principales microorganismos multirresistentes se tiene al *Acinetobacter baumannii* el cual ha sido declarada como un patógeno oportunista por la Sociedad de Enfermedades Infecciosas de América debido a lo problemático que se ha vuelto en las unidades de cuidados intensivos a causa de la resistencia que ha adquirido a un elevado número de antibióticos<sup>3</sup>.

Los carbapenémicos han sido los antibióticos de elección del tratamiento de las infecciones ocasionadas por *Acinetobacter baumannii* multidrogo resistente; sin embargo, en esta bacteria se han desarrollado diferentes mecanismos de resistencia, siendo el principal de ellos la vía enzimática mediada por “carbapenemasas”, específicamente las carbapenemasas de clase D u



oxacilinasas las cuales se encuentran a nivel plasmídico y/o cromosómico<sup>4,5,6,7,8</sup>. Asimismo, este mecanismo está determinado por la expresión de diversos genes codificantes de  $\beta$ -lactamasas clase “D”<sup>4,9,10,11</sup>.

De lo expuesto, se considera de gran importancia en cepas de *Acinetobacter baumannii* resistentes a carbapenémicos determinar la prevalencia de los genes bla<sub>OXA-23-like</sub>, bla<sub>OXA-24-like</sub> y bla<sub>OXA-58-like</sub>, debido a que solo se han encontrado dos estudios en Perú sobre la presencia de carbapenemasas en *Acinetobacter baumannii* y la propagación de clones internacionales II y III. Sin embargo, existen muy pocos estudios que permitan determinar la real frecuencia de genes codificantes de oxacilinasas en cepas de *Acinetobacter baumannii* en los hospitales de nuestro país; por lo cual es de suma importancia conocer el comportamiento genotípico ya que permitirá abrir nuevos objetivos de investigación en la Salud Pública para mejorar el tratamiento del paciente evitando complicaciones y/o fracasos terapéuticos. Estos resultados permitirán contribuir a la toma de la mejor decisión en cuanto a la administración de los antibióticos, reducir costos y disminuir la estancia de hospitalización de los pacientes. Asimismo la detección genotípica permitirá a las autoridades de salud formular un plan de contención, el cual permitirá la vigilancia permanente de brotes ya que estas enzimas se diseminan fácilmente en el ambiente hospitalario.

## 1.1 Objetivo general

Identificar y determinar la prevalencia de los genes bla<sub>OXA-23-like</sub>, bla<sub>OXA-24-like</sub> y bla<sub>OXA-58-like</sub> en cepas de *Acinetobacter baumannii* resistentes a carbapenémicos de un Hospital Nacional de Referencia en Lima durante el periodo diciembre del 2017 – marzo del 2018.

## 1.2 Objetivos específicos

- Determinar la presencia de las enzimas carbapenemasas mediante el método de inactivación de los carbapenémicos.
- Determinar la presencia del bla<sub>OXA-23-like</sub>, bla<sub>OXA-24-like</sub> y bla<sub>OXA-58-like</sub> a nivel genómico en cepas de *Acinetobacter baumannii* resistentes a carbapenémicos.
- Determinar la prevalencia de las enzimas carbapenemasas y de los genes bla<sub>OXA-23-like</sub>, bla<sub>OXA-24-like</sub> y bla<sub>OXA-58-like</sub> en las cepas recolectadas durante el periodo de estudio.

## II. GENERALIDADES

### 2.1 Antecedentes generales

Desde la década de 1970 el género *Acinetobacter* se reconoció como un patógeno para el ser humano, sin embargo, en las últimas décadas se ha incrementado el número de infecciones nosocomiales por la especie “*Acinetobacter baumannii*” en pacientes de la Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) (pudiendo causar septicemia nosocomial, neumonía e infecciones del tracto urinario) principalmente en hospitales de Estados Unidos, Europa, Asia y países Sudamericanos. Por otro lado, evidenciaron que aislamientos que procedían de países bajos, países nórdicos y de EE. UU poseían un patrón de resistencia menos extenso, finalmente diversos informes describían que estas cepas eran resistentes a todos los agentes antimicrobianos disponibles incluyendo las polimixinas (PDR)<sup>12</sup>.

En 1993 Paton et al. describieron por primera vez una betalactamasa tipo OXA con actividad carbapenemasa en *Acinetobacter baumannii*, la cual fue denominada inicialmente como ARI-1; posteriormente fue renombrada como OXA-23; el *Acinetobacter baumannii* resistente a carbapenémicos (CRAB) había sido aislada en 1985 de un paciente en Edimburgo, Escocia<sup>13,14</sup>.

Escandón K. et al. (2017) realizaron un estudio Epidemiológico de las Carbapenemasas en la cual refirió que el OXA-51, fue identificado por primera vez en seis cepas aisladas de *Acinetobacter baumannii* en hospitales de Buenos Aires, Argentina recolectadas entre 1993 y 1994. Asimismo, varios estudios realizados en diferentes naciones de América Latina y el Caribe han identificado en todos los aislamientos de *Acinetobacter baumannii* la presencia del gen bla<sub>OXA-51-like</sub>. Por otro

lado, en 1999 se produjo por primera vez un brote de cepas CRAB con el gen *bla*<sub>OXA-23-like</sub> en dos hospitales en Curitiba, Brasil. Asimismo, la primera carbapenemasa OXA-24, fue identificado por primera vez en un brote de cepas CRAB en 1997, Madrid, este OXA es menos diseminado que el OXA-23 pero hay informes crecientes de estas enzimas en Asia y América, finalmente indicó que el OXA-58 está globalmente distribuido con una prevalencia muy alta en el sur de Europa y en países mediterráneos<sup>15</sup>.

Warner W. et al. (2016), recolectaron 38 cepas de *Acinetobacter baumannii* resistentes a meropenem e imipenem, estas cepas pertenecían a dos brotes asociados a la atención médica (Unidad de quemados y UCI) que ocurrieron en dos hospitales del Condado de Los Ángeles, EE. UU en el año 2007 y 2009, mediante PCR múltiplex evidenciaron que 76% de las cepas presentaban el gen *bla*<sub>OXA-23-like</sub>, asimismo ninguna cepa presentó los genes *bla*<sub>OXA-24-like</sub> ni el *bla*<sub>OXA-58-like</sub>, y 100% de las cepas presentaba el gen *bla*<sub>OXA-51-like</sub> y el elemento de inserción ISAb<sub>1</sub>. Finalmente se atribuyó la resistencia a carbapenémicos a la presencia del gen *bla*<sub>OXA-23-like</sub> y al ISAb<sub>1</sub> ya que probablemente este elemento de inserción proporciona funciones promotoras exógenas para sobreexpresar al gen<sup>16</sup>. Por otro lado Raible K. (2017), evaluó 26 cepas clínicas de CRAB aisladas en un Hospital de Filadelfia en EE. UU; las cuales correspondieron al periodo de enero del 2010 a marzo del 2011 y de febrero a mayo del 2015, y a partir de su ADN genómico identificaron la presencia del gen *bla*<sub>OXA-51-like</sub>, *bla*<sub>OXA-58-like</sub>, *bla*<sub>OXA-23-like</sub> y el *bla*<sub>OXA-24-like</sub> en un 100%, 0%, 35 % y 12% respectivamente, por otro lado no evidenciaron las metalo  $\beta$ -lactamasas (*bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>GIM</sub>, *bla*<sub>SPM</sub>, *bla*<sub>SIM</sub>, *bla*<sub>DIM</sub> y *bla*<sub>NDM-1</sub>)<sup>17</sup>.

Según el estudio epidemiológico realizado en Europa por Glasner C. y colaboradores (2013), indicaron que el mecanismo más frecuente que conduce a la resistencia a carbapenémicos en *Acinetobacter baumannii* en Europa está mediado por las oxacilinasas adquiridas OXA-23, OXA-24, OXA-58, OXA-143 y OXA-235, también puede estar mediadas por las metalo  $\beta$ -lactamasas como la NDM, la cual se está notificando cada vez más en Europa como Croacia, República Checa, Alemania, Grecia, España, Italia, Letonia, Portugal, Reino Unido y Lituania<sup>18,19</sup>.

Nowak J. et al. (2017) aislaron 65 cepas de CRAB provenientes de 15 hospitales de Grecia, España e Italia; a través de PCR determinó la presencia del bla<sub>OXA-23-like</sub> y bla<sub>OXA-58-like</sub> asociado al ISAb<sub>a1</sub> y al ISAB<sub>A3</sub> respectivamente, las cuales se encontraron en 80% y 10.8% del total de las cepas. Asimismo, el bla<sub>OXA-24-like</sub> se evidenció en 3 cepas provenientes de España<sup>20</sup>. Por otro lado, Merino M. et al. (2014), aisló cepas de CRAB entre el 2011-2012 en la cual se evidenció la presencia del bla<sub>OXA-23-like</sub> reportándose como el primer brote de bla<sub>OXA-23-like</sub> en España<sup>21</sup>.

Según el estudio epidemiológico de Yang Hsu L. et al. (2016) reportó que en Pakistán el OXA-23 fue la carbapenemasa más prevalente en diversos reportes clínicos variando del 62% al 100% en aislados de CRAB. En aislamientos de CRAB de los Hospitales de Nepal y Vietnam todas las cepas presentaban el OXA-23 y algunas cepas presentaban el NDM-1. Asimismo, el último informe de la National Surveillance of Antimicrobial Resistance (NSAR) en Malasia recopiló datos proporcionados por 39 laboratorios de microbiología en el 2014, que

muestran que 57,3% de 15,533 aislamientos *Acinetobacter baumannii* eran resistentes a meropenem, asimismo, según el último informe The National Antimicrobial Resistance Surveillance Center (NARST) en Tailandia, 73,7% de los aislados de *Acinetobacter baumannii* en el periodo de enero a septiembre del 2015 resultaron resistentes al meropenem. En Filipinas el informe Antimicrobial Resistance Surveillance Program (ARSP) mostró que hubo un aumento significativo de los aislamientos del CRAB ya que en el año 2006 y 2010 era de un 27,2% y 22,1% respectivamente y en el 2015 fue 54,1%. En estos tres últimos países descritos el gen bla<sub>OXA-23-like</sub> fue el principal gen asociado con CRAB<sup>22</sup>.

Zhi Ning N. et al. (2017) realizaron un estudio en el que participaron 101 cepas clínicas de CRAB recolectadas del 2009 al 2014 en un Hospital de Beijing en las cuales se evidenció mediante PCR la expresión del gen bla<sub>OXA-51-like</sub> y bla<sub>OXA-23-like</sub> en todas sus cepas<sup>23</sup>. Asimismo en los estudios realizados por Han L. et al. (2017) en un Hospital de China aislaron 51 cepas clínicas de las cuales 45 de ellas eran resistentes a meropenem e imipenem, en este ensayo se usaron primers para detectar la presencia de los genes bla<sub>OXA-23-like</sub>, bla<sub>OXA-24-like</sub>, bla<sub>OXA-58-like</sub>, bla<sub>OXA-51-like</sub>, VIM, IMP, NDM, TEM, entre otros; de las cuales mediante PCR en tiempo real evidenciaron en todas sus cepas la presencia del gen bla<sub>OXA-23-like</sub> y bla<sub>OXA-51-like</sub>; en 41 cepas se encontró del gen bla<sub>TEM</sub> y en ninguna cepa se evidenció la presencia del gen bla<sub>OXA-24-like</sub> y bla<sub>OXA-58-like</sub><sup>24</sup>. Según otro estudio realizado en China por Yang D. (2015) mediante PCR evidenció la presencia del gen bla<sub>OXA-23-like</sub> y bla<sub>OXA-51-like</sub> en 85,37% (de 164 cepas de CRAB), y 4,8% (8 cepas) del bla<sub>OXA-58-like</sub><sup>25</sup>. Por otro lado según el estudio realizado por Ma. Z. et al. (2015) identificaron los genes

bla<sub>OXA-58-like</sub> y bla<sub>OXA-51-like</sub> en 41 cepas de CRAB de un total de 89 cepas aisladas<sup>26</sup>. Finalmente, Al Atrouni A. et al. (2016) aislaron 119 cepas clínicas de *Acinetobacter baumannii* en 7 hospitales de diferentes regiones de Líbano, de las cuales 91 cepas eran CRAB; asimismo evidenciaron mediante PCR que 76 cepas (83,5%) presentaban el gen bla<sub>OXA-23-like</sub>, 3 cepas el gen bla<sub>OXA-24-like</sub>, 4 cepas el gen bla<sub>NDM-1</sub> y una cepa presentó el gen bla<sub>OXA-143-like</sub><sup>27</sup>.

Handal R. et al. (2017) realizaron la caracterización de aislados de CRAB de un hospital de Palestina, para lo cual trabajó con 69 cepas, las cuales se corroboraron la especie a partir de la presencia del gen bla<sub>OXA-51-like</sub> a través de PCR ,para verificar la presencia de los principales genes asociados a la resistencia de carbapenémicos (bla<sub>OXA-23-like</sub>, bla<sub>OXA-24-like</sub> , bla<sub>OXA-58-like</sub>, bla<sub>OXA-143-like</sub> y bla<sub>OXA-235-like</sub>) se usó el PCR múltiple ,evidenciándose el bla<sub>OXA-23-like</sub>, bla<sub>OXA-24-like</sub> , bla<sub>OXA-58-like</sub>, bla<sub>OXA-143-like</sub> y bla<sub>OXA-235-like</sub> en 82.6%,14.5%,3% , 0% y 0% del total de las cepas respectivamente ,finalmente se evidenció la presencia de la metalobetalactamasa NDM en 5.8% de las cepas.<sup>28</sup>

Rezaei A. et al. (2017) determinaron la presencia de OXA a partir de ADN genómico a través de PCR múltiple en 153 aislamientos de CRAB en dos Hospitales de Irán durante el periodo del 2015 al 2016, el gen bla<sub>OXA-51-like</sub> se identificó en todas las cepas (100%), 90.8% y 62.1% de los aislamientos poseían el gen bla<sub>OXA-23-like</sub> y bla<sub>OXA-24-like</sub> respectivamente, mientras que el gen bla<sub>OXA-58-like</sub> no se detectó en ninguno de los aislados, concluyendo que el gen bla<sub>OXA-23-like</sub> y bla<sub>OXA-24-like</sub> fueron las principales carbapenemasas responsables de la resistencia antimicrobiana<sup>29</sup>.

Mohammad D. et al. (2017) Identificaron la presencia de bla<sub>OXA-23-like</sub> y bla<sub>OXA-51-like</sub> en 96% y 100% respectivamente de las 50 cepas clínicas aisladas de CRAB en la UCI de un hospital de Egipto<sup>30</sup>. Por otro lado Handal R. et al. (2017) determinaron mediante PCR la presencia de los genes bla<sub>OXA-23-like</sub>, bla<sub>OXA-24-like</sub>, bla<sub>OXA-58-like</sub>, bla<sub>OXA-51-like</sub> y NDM en un 82,6%, 14,5%, 3%, 100% y 5,8% respectivamente de las 69 cepas de CRAB recolectadas de un hospital de Palestina<sup>28</sup>.

Finalmente detectaron la presencia de los genes bla<sub>OXA-23-like</sub> y bla<sub>OXA-51-like</sub> en aislados de CRAB mediante PCR en Taiwán, Croacia, Yemen y Qatar<sup>31,32,33,34</sup>.

La carbapenemasa más frecuentemente descrita en América Latina es OXA-23. Asimismo, la emergencia del OXA-72 y NDM-1 viene a ser un nuevo hallazgo entre muchos países cercanos o muy alejados entre sí. Por el momento, la carbapenemasa OXA-143 únicamente se evidencio en cepas aisladas obtenidas en Brasil.<sup>35</sup>

Escandón K. et al. (2017) realizaron un estudio Epidemiológico de las Carbapenemasas en América Latina y el Caribe en la cual se indica que desde 1999 diversas publicaciones han informado sobre la presencia y amplia diseminación de la carbapenemasa OXA-23 en *Acinetobacter baumannii* en todo Brasil. Asimismo, en Venezuela, Fritsche et al. reportaron la primera *Acinetobacter* spp. productora de la carbapenemasa OXA-23 en cepas aisladas en 2002. Por otro lado, un estudio realizado en Colombia, por Villegas et al. analizaron la presencia de 65 cepas de *Acinetobacter baumannii* productores de la carbapenemasa OXA-23 que se obtuvieron durante el 2005 de un proyecto de vigilancia realizado en



siete hospitales de seis ciudades de Colombia ,este trabajo fue la primera descripción de la difusión nacional de la carbapenemasa OXA-23 en América Latina en la que la prevalencia de la resistencia a carbapenémicos se relacionó principalmente con la propagación clonal de los productores de la carbapenemasa OXA-23. En Chile, la carbapenemasa OXA-23 ha sido reportado en aislamientos de *Acinetobacter baumannii* recolectados desde el año 2007. Recientemente, la presencia de la carbapenemasa OXA-23 ha sido reportado en algunos aislados de *Acinetobacter baumannii* de Ecuador, Bolivia, Guadalupe (Antillas francesas), Paraguay y Uruguay<sup>15</sup>.

En América Latina la carbapenemasa OXA-24 fue reportado inicialmente en dos aislamientos de *Acinetobacter spp.* en el 2007 en México y Brasil. Pocos aislamientos de *Acinetobacter baumannii* portando bla<sub>OXA-24-like</sub> han sido reportados en Argentina, Colombia y Chile. Recientemente, Jamaica y Cuba también han informado la carbapenemasa OXA-24 en un 15-16% de aislamientos de *Acinetobacter baumannii* no susceptibles a carbapenémicos. Ecuador es el último país de América Latina en informar la carbapenemasa OXA-72 (Variante del OXA-24) de un brote nosocomial debido a *Acinetobacter baumannii* en dos centros médicos en Guayaquil, encontrando bla<sub>OXA-72-like</sub> en 86% de los 35 aislados analizados, también se ha evidenciado esta variante en Colombia en una cepa aislada a partir de un fluido peritoneal en el año 2006.Finalmente en México la la carbapenemasa OXA-72 parece ser el contribuyente más importante a resistencia a carbapenémicos en *Acinetobacter baumannii* en varios estudios llevado a cabo en diferentes ciudades en el norte y el centro de este país<sup>15,35</sup>.

Otro estudio realizado en seis hospitales de Caracas confirmaron la presencia de la carbapenemasa OXA-58 en cuatro aislamientos de *Acinetobacter baumannii*. En Brasil, dos informes han descrito la carbapenemasa OXA-58 durante el 2004-2005 en un par de aislados de *Acinetobacter baumannii*, la carbapenemasa OXA-58 ha sido identificado desde 2006 en México, Chile, Bolivia, Puerto Rico, Jamaica, Cuba. También hay informes en las cuales se describió la presencia de estas en Argentina<sup>15</sup>.

Villegas M. et al. (2007) aislaron 71 cepas de *Acinetobacter baumannii* resistentes a meropenem e imipenem pertenecientes a diez hospitales de Colombia durante el 2005; mediante PCR múltiple a partir de ADN genómico se confirmó que 65 cepas presentaban el gen bla<sub>OXA-23-like</sub> y 66, el gen bla<sub>OXA-51-like</sub>, finalmente no se encontraron metalo  $\beta$ -lactamasas <sup>36</sup>. Venegas J. et al. (2015) realizó un estudio descriptivo de corte transversal para evidenciar la presencia de genes en 32 cepas de CRAB aisladas en cinco hospitales de alto nivel de complejidad de Medellín, entre junio de 2012 y junio de 2014, la detección molecular se hizo mediante la amplificación por PCR de los genes del KPC, VIM, IMP, NDM, bla<sub>OXA-48-like</sub>, bla<sub>OXA-51-like</sub>, bla<sub>OXA-23-like</sub>, bla<sub>OXA-24-like</sub> y bla<sub>OXA-58-like</sub>, en la cual en todas las cepas se evidenció la presencia de los genes bla<sub>OXA-51-like</sub> y bla<sub>OXA-23-like</sub> <sup>4</sup>.

Cordero F. et al. (2016) aislaron 56 cepas de CRAB provenientes de la UCI de un hospital de Brasil, asimismo realizaron PCR múltiplex para investigar los genes que codifican las siguientes carbapenemasas: OXA-23, OXA-51, OXA-58, OXA-143, VIM y IMP; determinándose 51.2%, 100%, 0%, 18.6%, 0% y 0% respectivamente <sup>11</sup>.

Rocha L. et al. (2017) realizaron un estudio de perfil de susceptibilidad y diversidad de oxacilinasas en *Acinetobacter baumannii*, de 92 cepas aisladas de 4 estados de Brasil, determinándose que la enzima principal asociada a la resistencia a carbapenémicos era OXA-23 ya que se encontró en 94% del total de las cepas, seguida del OXA-24 ya que se encontró en 13% de las cepas, lo cual sugiere el comienzo de la propagación de este gen en Brasil, asimismo hasta la fecha, hay pocos informes del bla<sub>OXA-24-like</sub> en Brasil, pero todos están asociados con el fenotipo de resistencia a múltiples medicamentos<sup>37</sup>.

Estudios realizados por Nuñez T. et al. (2017) a partir de 35 aislamientos de CRAB recuperados de dos centros médicos en la ciudad de Guayaquil, Ecuador, entre noviembre del 2012 a octubre del 2013 identificaron la presencia del gen bla<sub>OXA-72-like</sub> (variante del bla<sub>OXA-24-like</sub>) en 30 cepas, siendo considerado el primer brote de este gen en América del Sur<sup>38</sup>.

Merkier A. et al. (2008) recolectaron 41 cepas de *Acinetobacter baumannii* de 3 hospitales de la ciudad de Buenos Aires, Argentina de 1995-2006, y mediante PCR detectaron que 26 cepas presentaban el gen bla<sub>OXA-23-like</sub>; en 13 cepas se detectó el gen bla<sub>OXA-58-like</sub> y bla<sub>OXA-51-like</sub> en todas las cepas ; el gen bla<sub>OXA-24-like</sub> no se encontró<sup>39</sup>.

Lopes B. et al. (2013) Mediante PCR múltiplex evaluaron la presencia de los principales genes asociados a la resistencia a Carbapenémicos como: bla<sub>OXA-23-like</sub>, bla<sub>OXA-24-like</sub>, bla<sub>OXA-51-like</sub>, bla<sub>OXA-58-like</sub> y bla<sub>OXA-143-like</sub>, en 14 cepas de CRAB provenientes de 3 hospitales de Cochabamba, Bolivia en el 2008-2009.

Concluyendo que la expresión de la resistencia a carbapenémicos se debe a la presencia del bla<sub>OXA-58-like</sub> con el elemento de inserción ISAba3, la cual se presentó en 100% de sus cepas, asimismo se confirmó que los aislados eran *Acinetobacter baumannii* por la presencia del bla<sub>OXA-51-like</sub> en 100% de las cepas<sup>40</sup>.

En el Perú, se muestra un incremento significativo de *Acinetobacter baumannii* desde el año 2002, ya que conforme a una investigación realizada en el Hospital Guillermo Almenara Irigoyen en Lima durante el periodo 2004 al 2006, se evidencio que el *Acinetobacter spp.* mostró poseer resistencia hacia los carbapenémicos del 40% durante ese periodo de estudio, asimismo se realizó un estudio en el Hospital Nacional Cayetano Heredia entre enero del 2010 y octubre del 2012, aquí se reportaron 222 casos de infecciones interhospitalarias donde 37.4% ocurrió en la UCI, encontrando que *Acinetobacter spp.* fue el agente más aislado con 29.3% en el área de cuidados intensivos de medicina y quirúrgicos, asimismo fue el segundo agente asociado a neumonías relacionadas a respiradores mecánicos con un 29.2%, y en casos de ITU relacionados a catéteres permanentes en la unidad de cuidados intensivos de emergencia se presentó con un 7.7%. Finalmente en la ciudad de Chiclayo, entre el periodo de enero y junio del 2015, surgió un brote de este microorganismo en la que dejo como resultado 176 muertos de las cuales 112 pacientes fallecieron en la UCI del hospital Almanzor Aguinaga Asenjo, 59 pacientes fallecieron en el Hospital Regional de Lambayeque y 5 personas fallecieron en el Hospital de las Mercedes<sup>41</sup>.

Por otro lado, Gastelo R. et al. (2016), realizaron la detección fenotípica de cepas productores de carbapenemasas en *Acinetobacter baumannii* con los siguientes

métodos: aproximación de discos, Hodge modificado y Blue Carba en cepas recolectadas en el 2014 al 2015 de los servicios de cuidados críticos (UCI, unidad de cuidados intermedios [UCIN] y UCI neonatal [UCI-NEO]) y emergencias del Hospital Regional Lambayeque-Perú. Como resultado todas las cepas de *Acinetobacter baumannii* fueron productoras de carbapenemasas tipo Oxacilinasas a las cuales se les atribuyo la resistencia a Carbapenémicos, asimismo el autor menciona que es probable que la resistencia a carbapenémicos en menor frecuencia pueda estar asociada a las metalo  $\beta$ -lactamasas. Finalmente este es el primer reporte en la región norte del Perú de la presencia de carbapenemasas en *Acinetobacter baumannii* <sup>42</sup>.

Finalmente Levy-Blitchtein et al. (2018) evaluaron los mecanismos moleculares de la resistencia a carbapenémicos y la epidemiología de 80 muestras clínicas de *Acinetobacter baumannii* recolectadas en febrero del 2014 a abril del 2016 en dos hospitales en Lima, reportando que 51 cepas (63.8%) estaban asociadas con la secuencia tipo 2 (ST2) y eran portadores del gen bla<sub>OXA-72-like</sub>, asimismo 13 (16.3%) asociados con ST79 y que también portaban el gen bla<sub>OXA-72-like</sub>, también identificaron cepas que producen ST1 y ST3 las cuales eran asociadas al gen bla<sub>OXA-23-like</sub>, este es el primer reporte en América Latina sobre la identificación de aislados de ST3 (IC-III).<sup>11</sup>

## 2.2 Marco teórico

### 2.2.1 *Acinetobacter baumannii*

La designación actual del género *Acinetobacter* fue inicialmente propuesta en 1954 por Brisou y Prevot con el fin de separar los organismos móviles de los inmóviles pero no fue hasta 1968 cuando esta designación fue ampliamente aceptada. Baumann y colaboradores publicaron un estudio en el que concluyen que todos los microorganismos similares descritos antes correspondían a un único género, en la cual propusieron el nombre de *Acinetobacter*. Ellos afirmaron que no es posible clasificar estos organismos en diferentes especies basándose en características fenotípicas. Ellos sostuvieron que no era factible clasificar estos organismos en diversas especies centrándose en características fenotípicas. Dichos hallazgos tuvieron como resultados la aceptación oficial del género *Acinetobacter* por el “Subcomité sobre la taxonomía de Moraxella y bacterias relacionadas” en 1971<sup>43,44,45,46,47</sup>.

Actualmente se han determinado 72 especies dentro del género *Acinetobacter* de las cuales 57 están validadas y que han sido definidas por hibridación ADN-ADN<sup>48</sup>. Las especies que están relacionadas con enfermedades en el humano son: *Acinetobacter calcoaceticus* (genoespecie 1), *Acinetobacter baumannii* (genoespecie 2), genoespecies 3 y 13 (cuyos nombres propuestos han sido *Acinetobacter pittii* y *Acinetobacter nosocomialis*, respectivamente), *Acinetobacter haemolyticus* (genoespecie 4), *Acinetobacter junii* (genoespecie 5), *Acinetobacter lwoffii* (genoespecie 8), *Acinetobacter johnsonii* y *Acinetobacter ursingii*<sup>49</sup>.

El género *Acinetobacter* se caracteriza por estar conformado por cocobacilos Gram negativos, que pueden observarse como bacilos ensanchados o extendidos en la fase exponencial de crecimiento y pueden ser identificados erróneamente como Gram positivos debido a que son difíciles de desteñir. La especie *Acinetobacter baumannii* son microorganismos que no poseen movilidad y se caracterizan por ser oxidasa negativa, catalasa positiva, no fermentadores y aerobios estrictos. En cultivos incubados a una temperatura de 37°C durante 24 horas se aprecian colonias con características viscosas, forma convexa, de color blanco grisáceo mientras que otras especies pertenecientes al complejo *Acinetobacter baumannii* - *Acinetobacter calcoaceticus* tienen mayor tamaño en comparación de las demás especies de *Acinetobacter* que poseen un diámetro desde 1.5 a 3 mm. Entre las pruebas que son utilizadas para su identificación a nivel de especie podemos mencionar como la principal prueba el crecimiento a 44°C<sup>45,50</sup>.

### **2.2.2 Importancia clínica**

El género *Acinetobacter* puede tolerar condiciones secas durante largos períodos, especialmente el *Acinetobacter baumannii* que puede sobrevivir en condiciones de bajos nutrientes. Gran parte del género *Acinetobacter* son bacterias que podemos encontrarlos en ambientes tales como agua, plantas, suelo, etc., inclusive en la microflora de la piel humana. No obstante, *Acinetobacter baumannii* es una bacteria que se ve con poca regularidad en el medio ambiente, del mismo modo que tampoco se le observa como colonizador en la comunidad. Por el contrario, este microorganismo coloniza e infecta pacientes hospitalizados en estado crítico, por

lo que es una bacteria frecuente en unidades de cuidado intensivo y unidades de quemados<sup>45,49</sup>.

La capacidad que tiene *Acinetobacter baumannii* para producir infecciones hospitalarias se basa en la capacidad para sobrevivir y propagarse rápidamente en el ambiente hospitalario obteniendo mecanismos de resistencia hacia los agentes antimicrobianos; por esta razón este microorganismo es uno de los más importantes desde el punto de vista clínico del género *Acinetobacter*<sup>51</sup>. La Sociedad Americana de Enfermedades Infecciosas (IDSA-2006) presentó al patógeno *Acinetobacter baumannii* en la lista de los microorganismos más peligrosos que se encuentran en los hospitales de todo el mundo<sup>52,53</sup>. Seguidamente (2009), se creó el término ESKAPE para designar a un grupo de bacterias resistentes a la acción de los antibióticos causantes de la mayoría de las infecciones nosocomiales en Estados Unidos<sup>54</sup>.



Tabla 1. Listado de los microorganismos del grupo ESKAPE.

<i>Enterococcus faecium</i> resistente a vancomicina
<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina (MRSA)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<i>Acinetobacter baumannii</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Enterobacter especies

El 27 de Febrero del 2017 en Ginebra, la OMS publicó “La primera lista mundial de patógenos prioritarios resistentes a los antibióticos”, en la que se presentó a 12 familias de bacterias consideradas las más peligrosas para la salud humana (*Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Helicobacter pylori*, *Campylobacter* spp., *Salmonella*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* y *Shigella* spp.), siendo consideradas las tres primeras como prioridad crítica debido a la peligrosidad de dichas bacterias tanto en hospitales, hogares o residencias para personas de tercera edad y en pacientes que utilicen dispositivos médicos como los ventiladores y catéteres intravenosos; por lo que pueden causar graves infecciones que a menudo son mortales, siendo los más frecuentes las neumonías y las infecciones a nivel sanguíneo. Asimismo, estos microorganismos adquirieron resistencia a gran parte de antibióticos tales como los carbapenémicos y las cefalosporinas de tercera generación (antibióticos empleados para tratar microorganismos multidrogo resistentes) <sup>55,56</sup>.

#### **2.2.2.1 Infecciones con *Acinetobacter baumannii***

Principalmente las infecciones con *Acinetobacter baumannii* involucran sistemas orgánicos que poseen altos niveles de líquidos. Dichos sistemas incluyen el tracto urinario y respiratorio, la cavidad peritoneal, entre otros; y están vinculados a dispositivos de uso permanentes<sup>51</sup>. Entre las principales infecciones tenemos:

#### A. Neumonía por *Acinetobacter* adquirida en el hospital

La neumonía relacionada a intubaciones y ventilaciones mecánicas es comúnmente vinculada a infecciones por *Acinetobacter baumannii*. Esto puede deberse a los largos periodos de hospitalización y al tiempo prolongado de ventilación mecánica que hacen que los dispositivos y equipos médicos involucrados en el cuidado respiratorio se contaminen, e incluso por la falta de higiene por parte de los profesionales de la salud<sup>49,57</sup>. En algunos estudios realizados en hospitales de Estados Unidos, entre 5% y 10% de los casos de neumonía adquiridas en UCI tuvieron como agente causal al *Acinetobacter baumannii*<sup>58</sup>.

#### B. Bacteriemia (infección del torrente sanguíneo)

*Acinetobacter baumannii* es la principal bacteria que se aísla de las bacteriemias nosocomiales y es en UCI donde se presentan el mayor número de casos de bacteriemias<sup>59</sup>. Existen varios factores relacionados con la adquisición de la bacteriemia nosocomial por *Acinetobacter baumannii*: la inmunosupresión, el antecedente de alcoholismo, el ingreso no programado de personal externo a UCI, pacientes con disfunción respiratoria, los episodios previos de sepsis en UCI y los procedimientos invasivos (catéteres intravasculares). Existen sitios de origen de estas bacteriemias por *Acinetobacter baumannii* tales como el tracto urinario, tracto respiratorio, catéteres, heridas quirúrgicas, entre otros<sup>60</sup>, pero también se ha evidenciado la frecuencia de bacteriemia polimicrobiana por parte del *Acinetobacter*. Por ejemplo los siguientes son copatógenos de *Acinetobacter*

*baumannii* en bacteriemia polimicrobiana: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter spp.*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Citrobacter spp.*, *Klebsiella spp.*, *Enterococcus*, *Staphylococcus* coagulasa negativo, *Staphylococcus aureus* meticilino resistente, *Bacteroides fragilis* y *Candida*<sup>61</sup>.

#### C. Infección del tracto urinario (ITU)

Diversos estudios reportan que *Acinetobacter baumannii* es una causa infrecuente de ITU. Este microorganismo es responsable aproximadamente del 1,6% de las ITUs adquiridas en UCI, por lo que generalmente este microorganismo se relaciona con infecciones que están asociadas al uso de catéter urinario. No es común que *Acinetobacter baumannii* cause ITU en pacientes ambulatorios<sup>45,62</sup>.

#### D. Meningitis

La meningitis nosocomial luego de una neurocirugía, causada por *Acinetobacter baumannii* resistente a antibióticos, es un problema cada vez mayor. La mayor parte de casos de meningitis se asocian con pérdidas de líquido cefalorraquídeo, drenajes ventriculares externos o traumatismos craneales<sup>45,63</sup>. La aparición de esta bacteria en los cultivos de líquido cefalorraquídeo o intracerebrales constituye un problema ya que pocas drogas logran concentraciones efectivas en dichos tejidos<sup>60</sup>.

#### E. Otras manifestaciones

Existe un pequeño número de casos reportados con problemas de endocarditis causada por *Acinetobacter baumannii*, la mayoría de estos casos se asocian con válvulas protésicas. El *Acinetobacter baumannii* también puede causar peritonitis, oftalmitis o queratitis asociada con el uso de lentes de contacto o después de una cirugía ocular<sup>51</sup>.

La mortalidad asociada a las infecciones por *Acinetobacter baumannii* es difícil de determinar ya que dicha bacteria infecta a pacientes con enfermedades graves y/o con diferentes comorbilidades<sup>49</sup>.

### **2.2.3 Resistencia del *Acinetobacter baumannii***

#### **2.2.3.1 Factores de virulencia**

Actualmente se habla poco en relación a los factores de virulencia de *Acinetobacter baumannii*, pero la realidad es que existen varios factores que favorecen el aumento de la multirresistencia, y esto se debe a que las especies de *Acinetobacter* pueden ser encontradas en objetos animados e inanimados. Dicha capacidad de sobrevivencia de esta bacteria se debe a que posee bajos requerimientos nutricionales para crecer sumada a su capacidad de multiplicarse en un amplio rango de temperatura y pH<sup>64</sup>. Los siguientes factores son:

##### **A. Formación de biopelículas:**

La formación de biopelículas del *Acinetobacter baumannii* le permite unirse con facilidad a las superficies abióticas y bióticas, incluido los dispositivos médicos y los tejidos del huésped, por ejemplo en el caso de superficies abióticas, estas

pueden formar biopelículas en vidrio o plástico<sup>65</sup>. Esta formación de biopelículas está relacionada con la producción de la Proteína Asociada a la Biopelícula (Bap) y con el ensamblaje del pili. Dicha formación de biopelículas tiene una variedad de vías que están regulados por el quórum sensing (sistema de comunicación que existe entre microorganismos con la cual controlan procesos específicos como la formación de biopelículas, manifestación de factores de virulencia, mecanismos de resistencia, etc.) y otros sistemas. Esta proteína Bap tiene un papel importante en la adhesión a las células epiteliales humanas, por lo que la inhibición de esta proteína puede prevenir las infecciones causadas por *Acinetobacter baumannii*. Según algunos estudios, las infecciones urinarias o de la circulación sanguínea asociadas con catéteres infectados con *Acinetobacter baumannii* pueden ser causadas por cepas que forman biopelículas. Esto se evidencio en un análisis proteómico en 2D de cepas aisladas formadores de película en la cual mostraron que la sobreexpresión de CarO, la captación de hierro y los sistemas pili están involucrados en el desarrollo de biopelículas<sup>50,66</sup>.

## **B. Sistemas de adquisición de hierro:**

El sistema de absorción de hierro es esencial para la supervivencia y la patogenicidad de las bacterias, sobretodo en el entorno de limitada concentración de hierro del huésped humano. En el caso del *Acinetobacter baumannii* crecido en condiciones bajas de hierro, experimenta cambios transcripcionales importantes no solo de genes asociados con la adquisición de hierro sino también de genes asociados con la motilidad<sup>45</sup>. También cabe señalar que *Acinetobacter baumannii* posee sistemas homeostáticos metálicos que son

necesarios para colonizar una gran variedad de tejidos. Varias investigaciones a nivel genómico de *Acinetobacter baumannii* han dado a conocer amplias distribuciones de sideróforos (proteínas de unión a hierro responsables de su captación) en cepas clínicas aisladas las cuales contribuyen a la capacidad patogénica de dicha bacteria<sup>67</sup>.

### **C. Lipopolisacáridos (LPS):**

Otro factor de virulencia es el Lipopolisacárido (LPS) el cual contiene el núcleo de hidratos de carbono, la fracción de lípido A, y un antígeno O. Este Lipopolisacárido origina una respuesta inmune innata y que a la vez es un elemento importante en el proceso de sepsis. Los Lipopolisacáridos procedentes de *Acinetobacter baumannii* inducen una reacción proinflamatoria contribuyendo trascendentalmente en la patogénesis de la infección causada por esta bacteria<sup>58,68</sup>.

### **D. Fosfolipasa D y C:**

Otras proteínas relacionadas a la virulencia de *Acinetobacter baumannii* son la fosfolipasa D y C, por ejemplo la fosfolipasa D es importante para la resistencia al suero humano, la evasión de células epiteliales y la patogénesis; mientras que la fosfolipasa C aumenta la toxicidad para las células epiteliales induciendo muerte celular a dichas células<sup>69,70</sup>.

Camarena et al. notó que la habilidad patogénica para inducir muerte celular del huésped disminuyó cuando se inactivó uno de los genes responsables de la Fosfolipasa C a comparación de cepas que no fueron manipuladas<sup>71</sup>.

#### **E. Proteína de membrana externa (OmpA):**

*Acinetobacter baumannii* tiende a adherirse fácilmente a las células epiteliales bronquiales y tiene la capacidad de provocar su apoptosis mediante la actividad de la OmpA. Esta proteína es considerada como uno de los principales determinantes en su capacidad de virulencia de dicha bacteria. Esta proteína se fija a la célula del epitelio y a las mitocondrias del huésped causando edema y disfunción de la mitocondria que luego terminara en apoptosis, lo que implica que esta podría ser una vía en la cual *Acinetobacter baumannii* causa daños durante una infección. Finalmente la proteína de superficie OmpA es la más abundante en este microorganismo y se le ha asociado con la resistencia al sistema de complemento y con la formación de biopelículas (ambos mecanismos importantes que inducen la supervivencia ya sea dentro como fuera del huésped)<sup>72</sup>.

#### **F. Vesículas de membrana externa (OMV):**

Estas vesículas de membrana externa poseen un diámetro medio de 20-200 nm y están constituidas por elementos de la membrana externa, fosfolípidos, lipopolisacáridos y proteínas periplásmicas. Dichas vesículas favorecen el ingreso de factores de virulencia hacia las células de huésped, la protección del microorganismo frente a la respuesta inmuno y la transferencia horizontal de genes; siendo asociadas finalmente en la virulencia del *Acinetobacter baumannii*<sup>5,73</sup>.



### 2.2.3.2 Mecanismos de resistencia

Actualmente, ciertas cepas de *Acinetobacter baumannii* son altamente resistentes a la mayoría de los antibióticos disponibles en el uso clínica. Se sabe que existen varios mecanismos de resistencia a muchas clases de antibióticos, Por ejemplo, los mecanismos de resistencia en CRAB (*Acinetobacter baumannii* resistentes a carbapenémicos) son las  $\beta$ -lactamasas, las bombas de eflujo, los defectos de permeabilidad y la alteración de los sitios diana. Varios de estos mecanismos pueden trabajar juntos para contribuir a la resistencia a una única clase de antibióticos, en este caso hacia los carbapenémicos<sup>74</sup>.

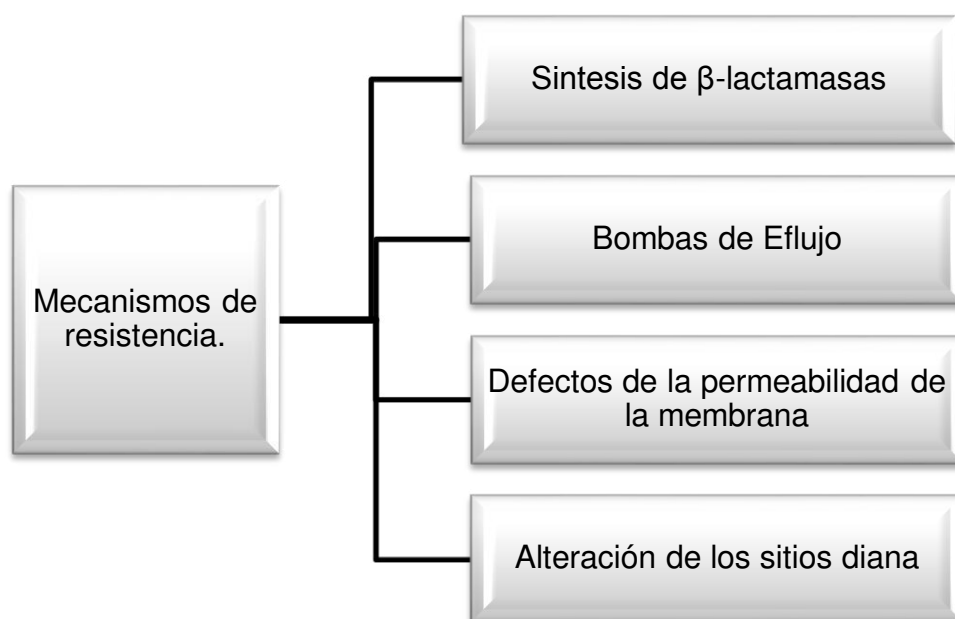


Figura 1. Mecanismos responsables de la resistencia a carbapenémicos del *Acinetobacter baumannii*

## A. Betalactamasas

En *Acinetobacter baumannii* el mecanismo de resistencia más importante a los antibióticos betalactámicos es la degradación enzimática (inactivación de los betalactámicos) por parte de las  $\beta$ -lactamasas. Las  $\beta$ -lactamasas están divididos en 4 clases de Ambler: la **clase A** también conocidas como Penicilinadas, la **clase B** también llamadas Metaloenzimas, la **clase C** conocidas también como Cefalosporinasas y la **clase D** o también llamadas Oxacilinasas<sup>75</sup>.

Las  $\beta$ -lactamasas de **clase A** son poco frecuentes en *Acinetobacter sp.* En este grupo se han identificado una serie de  $\beta$ -lactamasas del tipo TEM, SHV, GES, CTX-M, SCO, PER, VEB, KPC y CARB. Dentro de este grupo podemos encontrar  $\beta$ -lactamasas de espectro reducido tales como la TEM-1 y TEM-2, sin embargo posee una limitada importancia clínica debido a la fuerza de otros factores de resistencia. Por otra parte, en esta clase también podemos encontrar a las  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido por ejemplo, PER-1, TEM-92, CARB-10, SHV-5, PER-2, CTX-M-2, CTX-M-15, VEB-1, GES-14 y PER-7. Este tipo de  $\beta$ -lactamasas son inhibidos por el ácido clavulánico<sup>76</sup>.

Las  $\beta$ -lactamasas **clase B**, conocidas como metaloenzimas, son  $\beta$ -lactamasas dependientes de zinc y su actividad no es inhibida por los carbapenémicos tampoco por el sulbactam, tazobactam ni el ácido clavulánico (antibióticos que inhiben  $\beta$ -lactamasas). Esta clase de Ambler se caracteriza por hidrolizar todos los antibióticos betalactámicos englobando incluso a los carbapenémicos, a

excepción del aztreonam (monobactam). Dentro de esta clase se tiene tres grupos las cuales son el IMP, VIM y SIM<sup>77</sup>.

Las  $\beta$ -lactamasas **clase C**, conocidas como Cefalosporinasas, se codifican a nivel cromosomal por todos los *Acinetobacter baumannii*. Estas enzimas están asociadas a la resistencia de esta bacteria hacia las cefalosporinas de espectro extendido. Para el caso de las Cefepimas y carbapenémicos, estas parecen ser efectivas frente a estas enzimas. Estas enzimas se encuentran codificadas en el gen ampC que puede estar presente tanto en el cromosoma como en plásmidos<sup>78</sup>.

Las  $\beta$ -lactamasas de **clase D**, también llamadas oxacilinasas (OXA), se encuentran en especies de *Acinetobacter*. Estas oxacilinasas hidrolizan débilmente a carbapenémicos, imipenem y meropenem y no hidrolizan cefalosporinas de espectro extendido ni aztreonam. Los subgrupos de OXAs más prevalentes que hidrolizan carbapenémicos son los OXA-23, OXA-24, OXA-51 y OXA-58. Cabe señalar que el *bla*<sub>OXA-23-like</sub> fue la primera enzima identificada como tipo OXA (llamada inicialmente ARI-1 antes de ser secuenciada) en Edimburgo, Escocia, en el año de 1985; la cual tenía la característica de ser transferible. Tanto el gen *bla*<sub>OXA-58-like</sub> y *bla*<sub>OXA-23-like</sub> son codificados por plásmidos, lo que puede explicar su distribución generalizada. El gen *bla*<sub>OXA-51-like</sub> es el único que se manifiesta en forma natural en el *Acinetobacter baumannii*, de ahí su localización cromosómica y su uso como marcador de especie<sup>72,74</sup>.

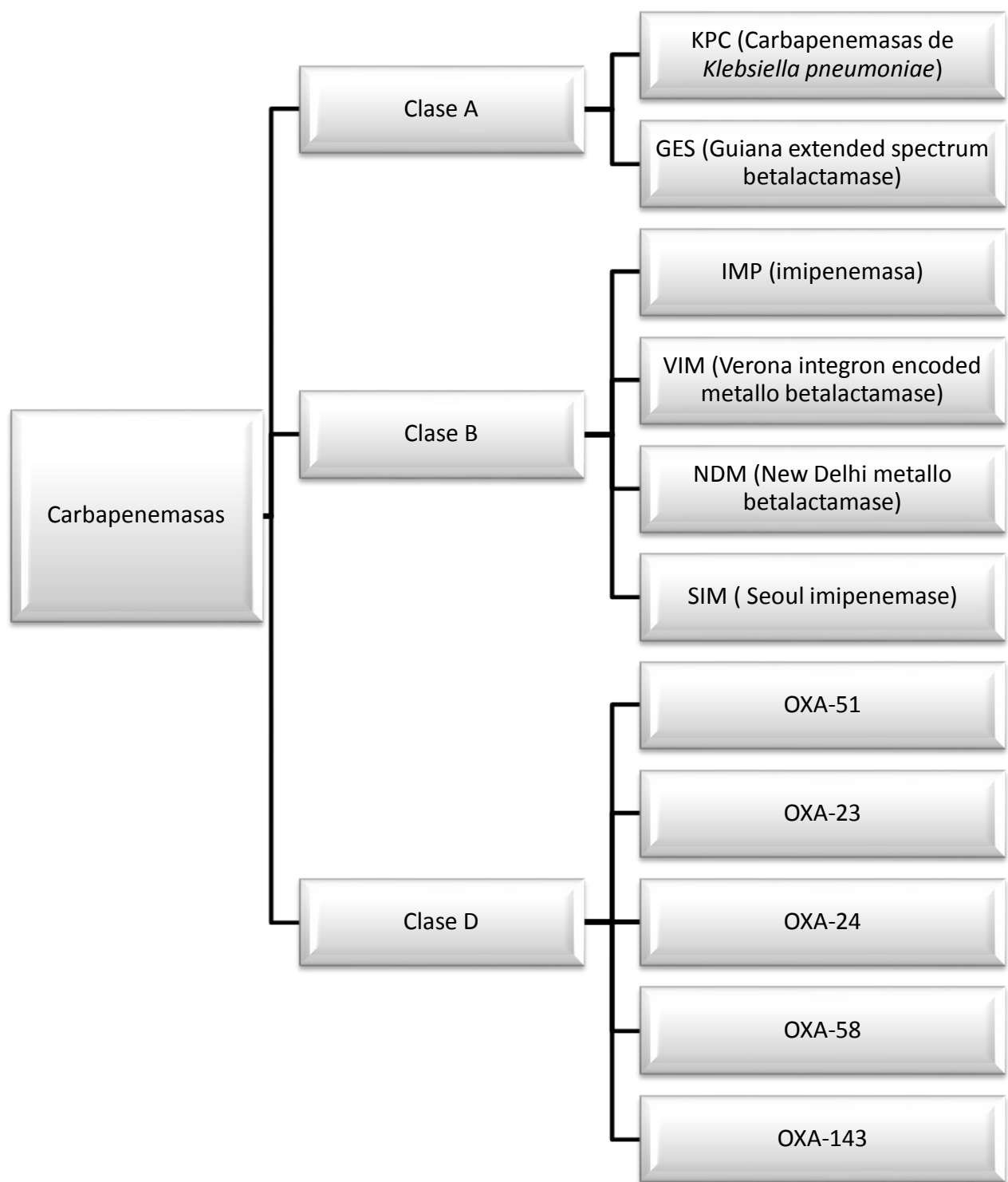


Figura 2. Carbapenemasas clínicamente relevantes en *Acinetobacter baumannii*.

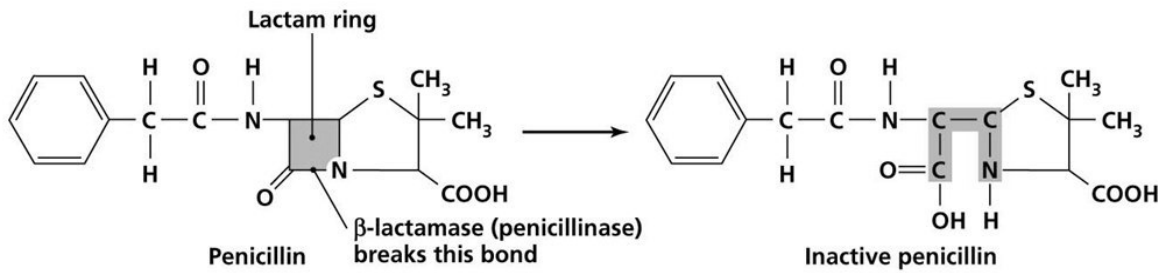


Figura 3. Mecanismo de acción de las  $\beta$ -lactamasas (Bocanegra P., 2013)

## B. Bomba de eflujo

Se llama bombas de eflujo a una serie de transportadores que expulsan, de manera inespecífica, sustratos que no están relacionados estructuralmente con el microorganismo. Las bombas de eflujo son un tipo de transportadores comprometidos con la captura de iones y nutrientes esenciales, eliminación de sustancias tóxicas y productos del metabolismo de la bacteria, asimismo que toma parte en los procesos de comunicación que existe entre las células y su entorno. Estas están divididas en 5 grupos o familias de las cuales 2 de ellas son llamadas "*ATP-binding cassette*" (ABC) y "*major facilitator superfamily*" (MFS); y son conocidos como superfamilias. Las 3 familias restantes son llamadas son conocidas como "*resistance nodulation cell division*" (RND), "*multidrug and toxic compound extrusion*" (MATE) y "*small multidrug resistance*" (SMR)<sup>79</sup>. La diferencia más resaltante entre estas familias es el tipo de fuente de energía que emplean para eliminar diferentes sustratos. Por ejemplo la superfamilia ABC es dependiente de la hidrólisis de ATP para eliminar diferentes productos; mientras que la familia MATE utiliza un gradiente electroquímico otorgado por  $\text{Na}^+$  o  $\text{H}^+$ .

Del mismo modo, la superfamilia MFS y las familias SMR y RND utilizan una fuerza protón motriz para realizar su función<sup>80</sup>. Vila y cols sustentaron que la resistencia a los múltiples antibióticos por parte de *Acinetobacter baumannii* se manifiesta en familias que emplean como fuente de energía la fuerza protón motriz.

En el caso de *Acinetobacter baumannii*, la principal bomba de eflujo relacionada con la resistencia a carbapenémicos es el AdeABC. Esta bomba pertenece a la familia RND y está compuesto por tres componentes: AdeA, que es una proteína de fusión de membrana, AdeB, que es un canal de proteína de membrana interna y la AdeC que viene a ser un canal de proteína de membrana externa o porina<sup>81</sup>. La sobreexpresión de esta bomba está regulada por los genes *adeS* y *adeR* que contribuyen a una mayor resistencia a los antimicrobianos, entre ellos: meropenem, fluoroquinolonas, tetraciclinas, cloranfenicol y aminoglucósidos. En el año 2005 se relacionó la bomba AdeABC con una menor susceptibilidad a carbapenémicos. En ese estudio un aislado poseía una alteración en un gen encargado de regular la expresión de AdeABC lo cual produjo una mayor expresión dicha bomba, reduciendo a la mitad la CIM (Concentración Inhibidora Mínima) del meropenem y del imipenem, en contraste con los resultados de la CIM de una cepa salvaje<sup>82</sup>. Por otro lado, Huang y cols (2008), relacionaron dicha bomba de manera directa con la resistencia hacia el meropenem. Dichos investigadores trabajaron con 2 cepas multirresistentes pero genéticamente distintas en la cual una de ellas sintetizaba la enzima OXA-23, mientras que la segunda cepa no era productora de esta enzima. Al final del estudio se concluyó

que esta cepa no productora de la enzima OXA-23 poseía un fenotipo de resistencia debido a una mayor expresión de la bomba AdeABC.

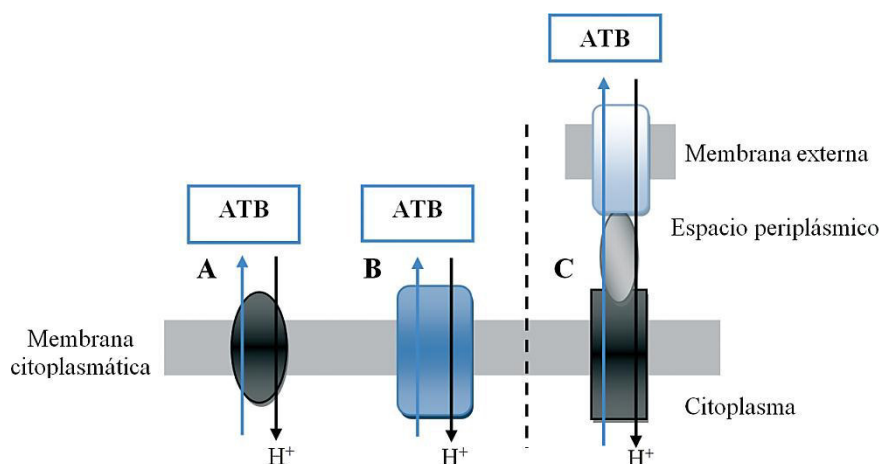


Figura 4. **A.** Bomba de expulsión de la superfamilia MFS. **B.** Bomba de expulsión de la familia MATE. **C.** Bombas de expulsión de la familia RND. ATB: Antibiótico. Los distintos antimicrobianos son expulsados desde el interior celular mediante un mecanismo de antiporte en relación con los protones. (Opazo et al., 2009).

### C. Defectos de la permeabilidad

Las porinas son proteínas que forman canales para permitir el transporte de moléculas a través de las membranas bilipídicas. Se ha evidenciado que la pérdida de estas proteínas de membrana externa (OMP) se asocia con la resistencia a los carbapenémicos<sup>83</sup>. También se ha visto que la pérdida de una proteína de membrana externa de peso molecular 29 kDa, denominada CarO, contribuye a la resistencia a carbapenémicos. En un estudio de Catel Ferreira y colaboradores, la disminución en la expresión de CarO demostró una reducción de la susceptibilidad a imipenem. También se han identificado OMP involucradas en la resistencia de *Acinetobacter baumannii* a los carbapenémicos, por ejemplo

una reducción en la expresión de dos porinas de pesos moleculares de 22 y 33 kDa estuvieron involucradas en la resistencia a carbapenémicos. En Estados Unidos, las cepas aisladas de CRAB encontrados en Nueva York tenían una expresión reducida de las proteínas de membrana externa de pesos moleculares de 47kDa, 44kDa y 37 kDa. En otros estudios, también se demostraron que una OMP de 33 a 36 kDa de peso molecular estaba asociado con la resistencia del *Acinetobacter baumannii* a carbapenémicos<sup>73</sup>.

#### **D. Alteración de la proteína de unión a penicilina (PBP)**

Los cambios en las proteínas de unión a penicilina (PBP) alteran los sitios diana para antibióticos<sup>84</sup>. Se ha demostrado que las modificaciones de las PBP juegan un papel importante en la resistencia de las bacterias Gram-negativas a los betalactámicos. Por lo tanto, las alteraciones en PBP pueden jugar un papel en la resistencia a los medicamentos de *Acinetobacter baumannii*<sup>85</sup>. La resistencia a imipenem se ha asociado con la sobreexpresión de ciertos PBP con baja afinidad. Gehrlein et al (Alemania), identificaron siete PBP en una cepa aislada de un paciente sensible a imipenem y en el clon de *Acinetobacter baumannii* resistente a imipenem (IR). En el clon resistente a imipenem (IR) de *Acinetobacter baumannii*, encontraron una disminución de las PBP, excepto la PBP de 24 kDa, que aumento y mostró baja afinidad por imipenem.<sup>73,85</sup> Cuenca et al. del Hospital Universitario de España hallaron grandes variaciones en los patrones de PBP y solo 6 PBP (93, 84, 73, 64, 49 y 38 kDa) con la expresión disminuida de PBD de 73 kDa en *Acinetobacter baumannii*. Ambos informes utilizaron el material radiactivo para la identificación de las PBP.



Tabla 2. Cuadro resumen de los mecanismos de Resistencia *Acinetobacter baumannii*.

ANTIMICROBIANO	MECANISMO DE RESISTENCIA	CLASE MOLECULAR
Betalactámicos	$\beta$ -lactamasas	<p><b>Clase A de Ambler:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• De espectro ampliado: TEM-1, TEM-2</li> <li>• De espectro extendido (BLEE): TEM-92, TEM-116, SHV-12, CTX-M-2, CTX-M-43, VEB-1, PER-1, PER-2.</li> </ul> <p><b>Clase B de Ambler (Métalo lactamasas):</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• IMP-1, IMP-2, IMP-4, IMP-5, VIM-1, VIM-2, SIM.</li> </ul> <p><b>Clase C de Ambler (Cefalosporinasas):</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• AmpC</li> </ul> <p><b>Clase D de Ambler (Oxacilinasas):</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• OXA-23, OXA-24, OXA-51, OXA-58, entre otros.</li> </ul>
	OMPs (proteínas de membrana externa)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• CarO ( 29 kDa)</li> <li>• 47-,44-, y 37 kDa OMPs</li> <li>• 22- y 33- kDa OMPs</li> <li>• 33- a 36- kDa OMPs</li> </ul>
	Bombas de eflujo	<ul style="list-style-type: none"> <li>• AdeABC</li> </ul>
	Alteración Proteína de unión a Penicilina (PBP)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Alteración PBP</li> </ul>

#### **2.2.4 Elementos genéticos móviles en *Acinetobacter baumannii* relacionados con la resistencia a carbapenémicos**

**Elementos transponibles:** Tienen la capacidad de moverse dentro del genoma bacteriano, pudiendo trasladarse de un sitio a otros. Estas transposiciones se consideran una de las causas principales de la reorganización bacteriana del ADN, que a su vez puede causar cambios en la expresión génica<sup>86</sup>. Para Halaji et al. (2018) en *Acinetobacter baumannii*, los elementos transponibles, como los transposones y las secuencias de inserción han sido responsables de la expresión y propagación de los mecanismos de resistencia antimicrobiana.

##### **A. Secuencias de inserción bacteriana (IS):**

Son los menos complejos de los tipos de elementos transponibles; en la cual rara vez superan los 2 kb de tamaño y pueden ser tan pequeños como de 0.5 kb. Estos elementos poseen un papel importante en la diseminación de genes de resistencia ya que la presencia de dos copias del mismo IS están al lado de una estructura compleja de un gen de resistencia llamado transposón compuesto. Los transposones compuestos pueden movilizar una variedad de genes de resistencia, lo que contribuye a la diseminación de la resistencia a los antimicrobianos. Algunos elementos de IS tienen un papel importante en la resistencia de *Acinetobacter baumannii* a los antimicrobianos. El ISAb1, ISAb2, ISAb3, ISAb4 e IS18 se asocian comúnmente con la expresión de los genes de las carbapenemasas.<sup>87</sup> Villalón et al. (2013) investigaron la presencia de estos elementos IS en 59 cepas aisladas multiresistentes de *Acinetobacter*

*baumannii* y observaron una prevalencia del 93,2%, 25,4%, 20,3% y 5,1% para ISAb1, ISAb2, ISAb3 e IS18, respectivamente. ISAb4 no se detectó en ninguna de las cepas aisladas en este estudio.

Es importante señalar que los elementos de IS como ISAb1 contribuyen a la propagación de genes de carbapenemasas entre diferentes especies de *Acinetobacter*.<sup>88</sup> Poirel et al. (2008) plantearon que era probable que bla<sub>OXA-23-like</sub> se movilizara por la secuencia de inserción de ISAb1 del *Acinetobacter radioresistens* al *Acinetobacter baumannii*. Los autores demostraron que *Acinetobacter radioresistens* es el progenitor del gen similar a bla<sub>OXA-23-like</sub>, que se movilizó a *Acinetobacter baumannii* mediante inserciones de ISAb1 secuencia proporcionada por *Acinetobacter baumannii*.

Segal et al. (2005) identificaron ISAb1 en aislamientos de *Acinetobacter lwoffii*, demostrando la alta movilidad de estos elementos e indicando que los eventos de transposición del ISAb1 ocurren con frecuencia.

## **B. Transposones:**

Los transposones en *Acinetobacter baumannii* son estructuras genéticas que poseen importantes genes resistentes, como bla<sub>OXA-23-like</sub>. Existen tres transposones que se han asociado con bla<sub>OXA-23-like</sub>: Tn2006, Tn2007 y Tn2008. En el Tn2006, el gen bla<sub>OXA-23-like</sub> está acompañado por dos copias de la secuencia de inserción ISAb1, que se encuentra en direcciones opuestas. El Tn2008 es similar al Tn2006 pero carece de la segunda copia de ISAb1. Finalmente en el Tn2007, el gen bla<sub>OXA-23-like</sub> se asocia con una copia de ISAb4

localizada de este gen. Varios estudios han demostrado que el Tn2006 es actualmente el principal determinante de la resistencia a carbapenemicos, con una gran capacidad de propagarse entre cepas aisladas de *Acinetobacter baumannii*<sup>86,88</sup>.

### **C. Integrines:**

Actualmente, se tiene cinco clases diferentes de integrines móviles. De estas cinco, tres clases de integrines (clases 1, 2 y 3) tienen un papel importante en la diseminación de genes de resistencia a los antimicrobianos. Varios estudios demostraron una alta prevalencia de integrines de clase 1 en cepas aisladas de *Acinetobacter baumannii* en Europa, Asia y Estados Unidos. Debido a que poseen mayor capacidad de propagación, los integrines de clase 1 son el modelo experimental principal de los integrines. Esta clase comúnmente está relacionada a transposones funcionales o no funcionales derivados de Tn402 que pueden insertarse en transposones más grandes como Tn21. No obstante de los informes de una mayor prevalencia de integrines de clase 1 en *Acinetobacter baumannii*, existen estudios realizados en países de América Latina como Chile, Argentina y Brasil que demuestran una mayor prevalencia de integrines de clase 2 entre cepas aisladas de *Acinetobacter baumannii* en estas regiones. Fonseca et al. (2011) demostraron que todos los integrines de clase 2 obtenidos de cepas aisladas brasileñas se insertaron en el transposón Tn7<sup>89</sup>.

### **III. PARTE EXPERIMENTAL**

#### **3.1 MATERIALES, REACTIVOS Y EQUIPOS**

##### **3.1.1 Materiales**

- Cuvetas estériles.
- Placas petri estéril descartable 90x15 mm.
- Asas de siembra.
- Asas de siembra estériles 10µl.
- Portaobjetos.
- Tubos de ensayo de vidrio (Pyrex).
- Frascos de vidrio 250mL, 500mL y 1L (Pyrex).
- Pipetas de vidrio 10mL y 20mL (Pyrex).
- Propipetas.
- Micropipetas de 0.5µl - 10µl, 10µl - 100µl y de 100µl - 1000µl.
- Tips para micropipetas.
- Tubos eppendorf 1.5mL.
- Hisopos estériles.
- Pinzas metálicas estériles.
- Probetas 100 mL y 500 mL (Pyrex).

##### **Material biológico**

- *Acinetobacter baumannii* – cepa aislada en hospital
- *Escherichia coli* ATCC 25922.
- *Acinetobacter baumannii* – cepa aislada en hospital (control negativo).

- *Klebsiella spp.*-cepa clínica (control positivo).

### **Medios de cultivo**

- Agar Trypticase Soya TSA (Merck).
- Caldo Trypticase Soya TSB (Merck).
- Agar Mueller Hinton (Merck).
- Agar citrato de Simmons (Merck).
- Agar Triple Sugar Iron (Merck).

#### **3.1.2 Reactivos**

- Agua destilada.
- Aceite de inmersión.
- Solución de cristal violeta.
- Solución de Lugol.
- Solución de decoloración (alcohol-acetona 5:3).
- Solución de Safranina.
- BactiDrop Oxidasa (Remel).
- Agua Oxigenada 10 volúmenes.
- Alcohol absoluto 96%.
- Lisozima (50mg/mL).
- Suero fisiológico estéril.
- Agua para inyección.
- Escala de McFarland 0.5.
- Glicerol 15%.

- Discos de Meropenem 10mcg (Bioanalyse).
- Fluorescent dye reagent 6X (Geneon).
- DNA Loading dye 6X (Fermentas).
- Ladder 100bp ADN (Axygen).
- Buffer TBE 0.5X.
- Gel de Agarosa al 2%.
- Cebadores para bla<sub>OXA-23-like</sub>, bla<sub>OXA-24-like</sub> y bla<sub>OXA-58-like</sub> (Invitrogen).

### **3.1.3 Equipos**

- Autoclave (ALP).
- Balanza analítica (Sartorius).
- Cabina de Bioseguridad Clase II (Telstar).
- Balanza electrónica (Denver Instrument).
- Incubadora (Incucell y XMDT series TEMP CONT).
- Baño maria con agitación (Selecta Digiterm 100).
- Centrifugadora (K model : PLC-012E).
- Microscopio (Optika).
- Refrigeradora (Coldex).
- Congeladora (Bosh).
- Vortex (D LAB).
- Termociclador (Eppendorf Mastercycler).
- Fuente de alimentación de voltaje (Biometra standard power pack p25).
- Equipo de electroforesis (Compact XS/S Biometra).
- Transiluminador (UV star 312nm Biometra).

- PC con software IBM SPSS Statistics.

#### **3.1.4 Otros**

- Mix PCR.
- Kit de extracción de ADN Genómico (Vivantis).

#### **Entidades que permitieron el desarrollo de la investigación**

El presente trabajo de investigación se desarrolló entre los meses de setiembre del 2017 a mayo del 2018. La recolección de las cepas, identificación bioquímica y el perfil de resistencia del *Acinetobacter baumannii*, se llevó a cabo en el Laboratorio Clínico de un Hospital Nacional de Referencia en Lima. La preservación y reactivación de las cepas, así como la detección fenotípica de carbapenemasas, extracción del ADN genómico y la detección Genotípica se realizó en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

#### **Tipo de estudio**

El estudio es de tipo observacional descriptivo y transversal.



### **3.2 Recolección y preservación de muestras**

Se recolectaron 51 cepas aisladas resistentes a carbapenémicos e identificados como *Acinetobacter baumannii* conservadas en caldo tripticasa soya con glicerol al 20 % a una temperatura de -20°C en crioviales de un Hospital Nacional de Referencia en Lima, entre los meses de diciembre del 2017 a marzo del 2018. Las cepas de *Acinetobacter baumannii* fueron preservadas en caldo tripticasa soya con glicerol al 20 % a una temperatura de -20°C en crioviales.

#### **3.2.1 Reactivación e identificación de muestras**

Las muestras clínicas que llegaron al laboratorio de microbiología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, fueron reactivadas en agar tripticasa soya durante un periodo de incubación de 24 horas a 37°C. Seguidamente se realizó la tinción Gram.<sup>90</sup>

En un portaobjetos limpio se le adicionó un par de gotas de una solución salina estéril, seguidamente con ayuda de un asa bacteriológica se colocó una porción de la colonia a estudiar sobre la solución salina homogenizando el inóculo sobre dicha sustancia y se dejó secar. Luego se aplicó calor sobre el portaobjetos con el fin de fijar el inóculo para luego cubrirlo con cristal violeta durante 1 minuto. Posteriormente se enjuaga con agua, luego se aplicó lugol dejándolo reposar por 1 minuto y se volvió a enjuagar con agua. Paso siguiente, se decoloró con una mezcla de alcohol y acetona en una proporción de 70:30 durante 5 segundos. Luego se enjuaga con agua y se le adiciona el reactivo de safranina durante 1 minuto. Finalmente se enjuaga con agua y se dejó secar a temperatura ambiente.

La identificación se realizó en un microscopio empleando los objetivos de 40X y 100X.

*Acinetobacter Baumannii* es cocobacilo Gram negativos que se disponen en parejas, cadenas o agrupaciones irregulares tiñéndose de color rosado<sup>91</sup>.

Para la identificación bioquímica se utilizaron las siguientes pruebas<sup>92</sup>:

#### **A. Utilización de citrato**

Las cepas de *Acinetobacter baumannii* fueron sembradas usando la técnica de siembra en estría en un tubo conteniendo agar Citrato de Simmons y se incubó durante 24 horas a 37°C. El empleo del citrato se observa por un cambio del color verde a azul que se produce cuando hay formación de productos alcalinos producto de la utilización del citrato produciéndose un viraje del indicador. *Acinetobacter baumannii* es citrato positivo.

#### **B. Utilización de glucosa y lactosa**

Las cepas fueron sembradas en estría y en profundidad en el medio Triple Sugar Iron (TSI) y luego se dejó en incubación a 37°C por 24 horas.

En los microorganismos fermentadores se observa un cambio en la coloración del medio de rojizo a amarillo en el fondo o por completo. *Acinetobacter baumannii* no presentó fermentación de la glucosa ni lactosa, por lo tanto no mostró cambio de color en el medio TSI.

### **C. Prueba de la oxidasa**

Una cepa de *Acinetobacter baumannii* crecida en agar Tripticasa Soya (TSA) se transfirió sobre una tira de papel de filtro Whatman (N°1). Posteriormente se dispuso 1 o 2 gotas de reactivo BactiDrop™ Oxidase (N,N,N,N-tetrametil-1,4-fenilenediamina, ácido ascórbico, agua desmineralizada) .

El objetivo fue detectar la enzima citocromo oxidasa. (Ver anexo N°1).

La reacción se consideró positiva cuando a los 10 a 30 segundos viró a un color azul o violeta azulado. Se considera reacción negativa cuando no hay cambios de color. *Acinetobacter Baumannii* es oxidasa negativa.

### **D. Crecimiento a 44°C**

La cepa se sembró sobre agar TSA y se incubó a 44°C por 24 hrs. *Acinetobacter baumannii* crece bajo esas condiciones.

### **E. Prueba de la catalasa**

Esta prueba se realizó en un portaobjetos limpio y seco en la cual se le agregó un par de gotas de peróxido de hidrógeno de 10 volúmenes a dicho material. Seguidamente, con ayuda de un asa bacteriológico, se tomó una parte de la colonia a analizar y se transfirió hacia las gotas de peróxido de hidrogeno observándose la formación de burbujas de oxígeno.

La reacción positiva se evidencia producción de una gran cantidad de burbujas. La reacción negativa se evidencia ausencia de burbujas o muy poca cantidad. *Acinetobacter Baumannii* es catalasa positivo.

### **3.2.2 Susceptibilidad antimicrobiana**

La prueba de susceptibilidad antimicrobiana se realizó en el “Hospital Nacional de Referencia en Lima” por el método de disco de difusión, siguiendo las recomendaciones del Clinical and Laboratory Standards Institute 2018 M100-ED28. (CLSI 2018)<sup>93</sup> y el manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco de difusión del Instituto Nacional de Salud (INS 2002)<sup>94</sup>. (Ver anexo N°2).

### **3.3 Detección fenotípica**

#### **3.3.1 Método de inactivación de los carbapenémicos (MIC\*)**

Esta técnica se sustenta en la capacidad de la enzima carbapenemasa de hidrolizar la concentración de 10µg de Meropenem (MEM) presente en un sensidisco de papel de filtro.<sup>95</sup> Consta de dos pasos: (i) incubación de un disco de meropenem con el aislamiento a analizar en un medio de agua destilada estéril; y (ii) la incubación de este disco de meropenem con la cepa ATCC 25922 de *Escherichia coli*. Después de esta segunda etapa de incubación, la presencia de actividad carbapenemasas puede detectarse fácilmente: la ausencia de una zona de inhibición indica hidrólisis enzimática de meropenem durante la primera etapa de incubación, mientras que aparece una "zona de inhibición clara" cuando el aislado probado no expresa actividad carbapenemasas<sup>96</sup>.

Interpretación:<sup>97</sup>

- *Carbapenemasa positivo*: Zona de inhibición de 6-15 mm o presencia de colonias dentro de una zona de 16-18 mm.

Si el ensayo aislado produce carbapenemasas, el meropenem en el disco se hidrolizará y no habrá inhibición o existirá una inhibición limitada del crecimiento de *E. coli* ATCC 25992 susceptible a meropenem.

- *Carbapenemasa negativo*: zona  $\geq 19$  mm.

Si el aislamiento de prueba no produce carbapenemasas, el meropenem en el disco no se hidrolizará e inhibirá el crecimiento de *E. coli* ATCC 25922 susceptible a meropenem.

### **3.4 Detección genotípica**

#### **3.4.1 Extracción del ADN genómico**

Las cepas de *Acinetobacter baumannii* se reactivaron en tubos de ensayo con caldo TSB durante 24hrs y se centrifugaron 1.5mL del cultivo bacteriano a 6000 x g durante 2 minutos en un tubo eppendorf, decantándose el sobrenadante por completo. Resuspendemos el sedimento por completo adicionando 100µl del Buffer R1 con el vortex, adicionamos 10µl de lisozima (50mg/mL) y centrifugamos 10 000 x g durante 3 minutos y decantamos el sobrenadante por completo. Resuspendemos el sedimento adicionando 180µl del Buffer R2 y 20µl de la Proteinasa K mezclamos por completo con el vortex y lo llevamos a baño maria a 65°C durante 20 minutos agitándolo constantemente, adicionamos 400µl del Buffer BG mezclamos la solución e incubamos durante 10 minutos a baño maria a 65°C. Adicionamos 200µl del etanol absoluto y mezclamos. Transferimos la solución a la columna ensamblada a un tubo de recolección y centrifugamos a 10 000 x g por 1 minuto y descartamos el flujo, lavamos la columna agregando 650µl

del Wash Buffer ( resuspendido con 5.6mL de etanol absoluto ) y centrifugamos a 10 000 x g por 1 minuto y descartamos el flujo, removemos el etanol residual mediante la centrifugación de la columna 10 000 x g por 1 minuto, coloco la columna en un tubo eppendorf limpio y agrego a la columna 100µl del elution Buffer precalentado un minuto a 65°C, y se deja reposar unos 2 minutos, centrifugamos a 10 000 x g durante 1 minuto y almacenamos el ADN de 4°C a - 20°C (Ver Anexo N°3 )<sup>98</sup>.

### 3.4.2 Detección de la presencia de genes

Se amplificaron los genes codificantes de las Oxacilinasas (OXA) para las familias más ampliamente diseminadas bla<sub>OXA-23-like</sub>, bla<sub>OXA-24-like</sub> y el bla<sub>OXA-58-like</sub> por la reacción en cadena de la polimerasa múltiplex (PCR múltiplex), con los pares de cebadores que se muestran en la tabla siguiente:

Tabla 3. Secuencia de los cebadores para la detección de OXA en *Acinetobacter baumannii*, en la prueba de PCR múltiplex y el tamaño del producto de amplificación<sup>99,28</sup>.

Gen	Secuencia (5' a 3')	Pb
bla <sub>OXA-23-like</sub>	F: GATCGGATTGGAGAACCAGA R: ATTTCTGACCGCATTTCAT	501
bla <sub>OXA-24-like</sub>	F: GGTTAGTTGGCCCCCTTAAA R: AGTTGAGCGAAAAGGGGATT	246
bla <sub>OXA-58-like</sub>	F: AAGTATTGGGGCTTGTGCTG R: CCCCTCTGCGCTCTACATAC	599

Tabla 4. Mezcla de reacción (Mix PCR):

Reactivo	Volumen (μl)
Buffer 10X	2.5
MgCl <sub>2</sub> 100Mm	1
Mix dNTPs 10Mm	0.5
Cebador F 10 pmol/μl (bla <sub>OXA-23-like</sub> )	1
Cebador R 10 pmol/μl (bla <sub>OXA-23-like</sub> )	1
Cebador F 10 pmol/μl (bla <sub>OXA-24-like</sub> )	1
Cebador R 10 pmol/μl (bla <sub>OXA-24-like</sub> )	1
Cebador F 10 pmol/μl (bla <sub>OXA-58-like</sub> )	1
Cebador R 10 pmol/μl (bla <sub>OXA-58-like</sub> )	1
DNA molde	1
Agua para inyección	13.8
Taq 5U/μl	0.2

Los reactivos empleados fueron de Geneon, excepto los Cebadores y el Mix dNTPs, estos fueron de Invitrogen y Promega respectivamente. Se empleó un termociclador (Eppendorf Mastercycler) y las condiciones fueron:

1 ciclo de 5 minutos a 94°C para la desnaturalización inicial; seguido por 33 ciclos de: desnaturalización 94°C por 25 segundos, alineación 53°C por 40 segundos, amplificación 72°C por 50 segundos y por último 1 ciclo a 72°C por 6 min para la elongación final<sup>99</sup>.

### 3.4.3 Análisis de resultados

Los productos de amplificación fueron resueltos por Electroforesis en agarosa al 2%, el cual se sometió a 85V por 45 minutos. Se empleó un Ladder de 100 - 3 000 bp. Las bandas resultantes se visualizaron con un transiluminador UV (UV star 312nm Biometra).

Los fragmentos esperados para los distintos productos de amplificación correspondientes a los genes codificantes de OXA fueron: bla<sub>OXA-23-like</sub>: 501, bla<sub>OXA-24-like</sub>: 246 y bla<sub>OXA-58-like</sub>: 599<sup>99,28</sup>.

### 3.5 Aspectos éticos

Se recolectaron cepas conservadas resistentes a carbapenémicos e identificados como *Acinetobacter baumannii* de un Hospital Nacional de Referencia en Lima.

Durante el presente estudio no se trabajó con muestras directas de pacientes ni con sus historias clínicas. Es por ello que no se vulneró la confidencialidad de la información de los pacientes.



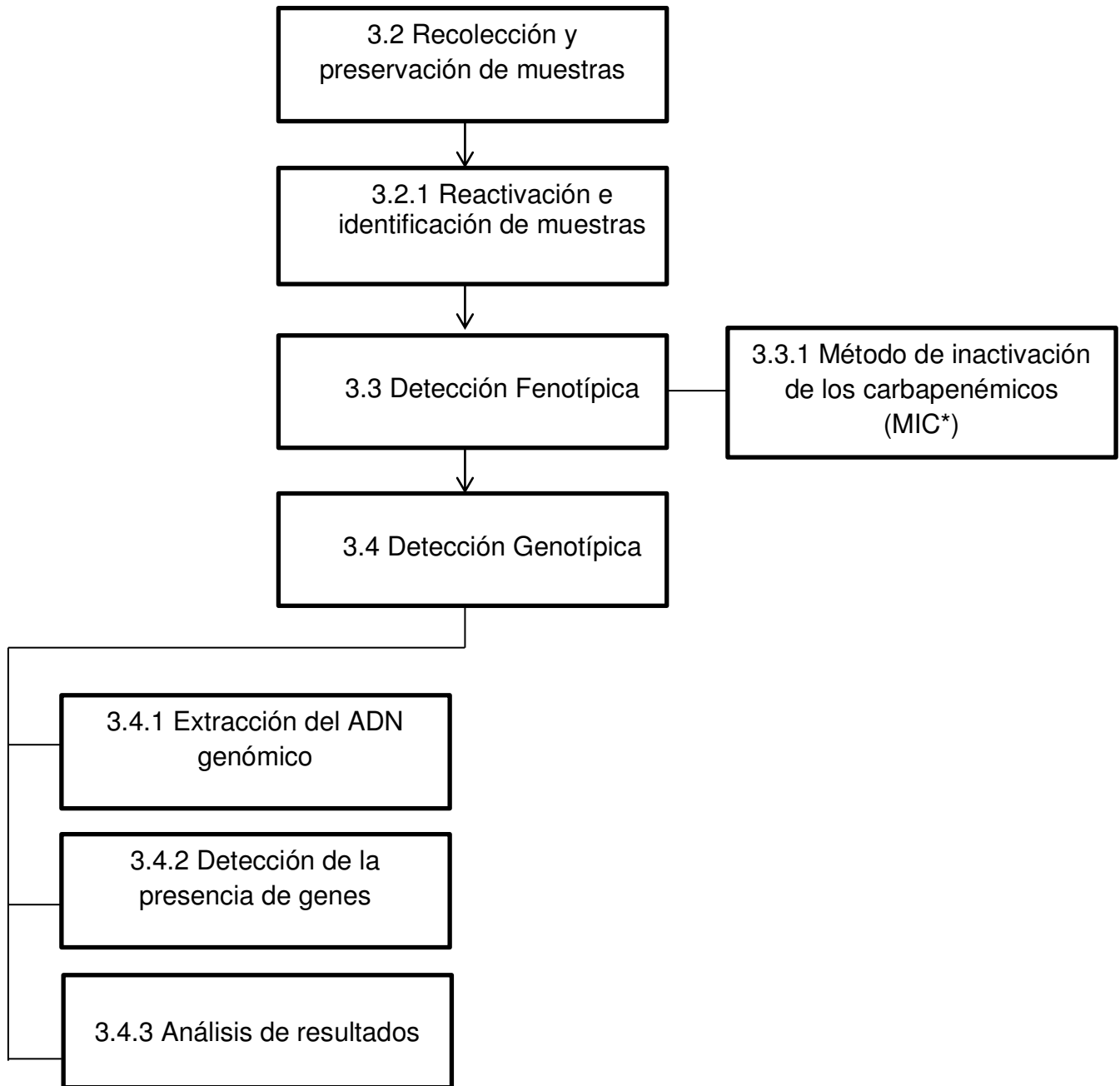


Figura 5. Diagrama de flujo de la parte experimental de la detección fenotípica y genotípica en cepas de *Acinetobacter baumannii* resistentes a carbapenémicos.

## IV. RESULTADOS

### 4.1 Origen de las cepas recolectadas

Se recolectaron 51 cepas aisladas resistentes a carbapenémicos e identificados como *Acinetobacter baumannii* conservadas en caldo tripticasa soya con glicerol al 20 % a una temperatura de -20°C en crioviales de un Hospital Nacional de Referencia en Lima, entre los meses de diciembre del 2017 a marzo del 2018. (Ver Anexo N°4).

### 4.2 Detección fenotípica

La detección fenotípica de carbapenemasas realizadas a las 51 cepas recolectadas de *Acinetobacter baumannii* tuvo como resultados positivos 51/51 (100%). Esto nos indica que las enzimas carbapenemasas tienen prevalencia en las cepas aisladas. (Ver tabla 5 y figuras 5, 6 y 7)

Tabla 5. Detección fenotípica de carbapenemasas en 51 cepas de *Acinetobacter baumannii*.

Fenotipo productor de carbapenemasa	Cantidad	Porcentaje (%)	Prevalencia (x100)
Carbapenemasa positivo	51	100	100%
Carbapenemasa negativo	0	0	
Total	51	100	

De la tabla se aprecia que la totalidad de muestras son carbapenemasa positiva, con una prevalencia de 100%.

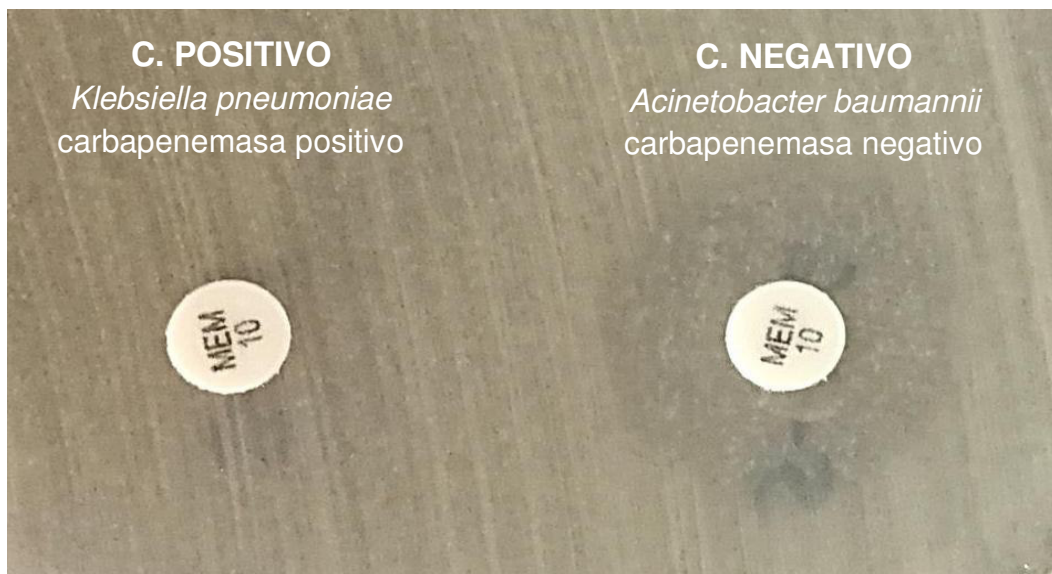


Figura 6. Prueba MIC\*: Control positivo (cepa de *Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa positivo) con ausencia de una zona de inhibición que indica hidrólisis enzimática del meropenem; y control negativo (cepa de *Acinetobacter baumannii* carbapenemasa negativo) con presencia de una zona de inhibición debida a la ausencia de carbapenemasas.

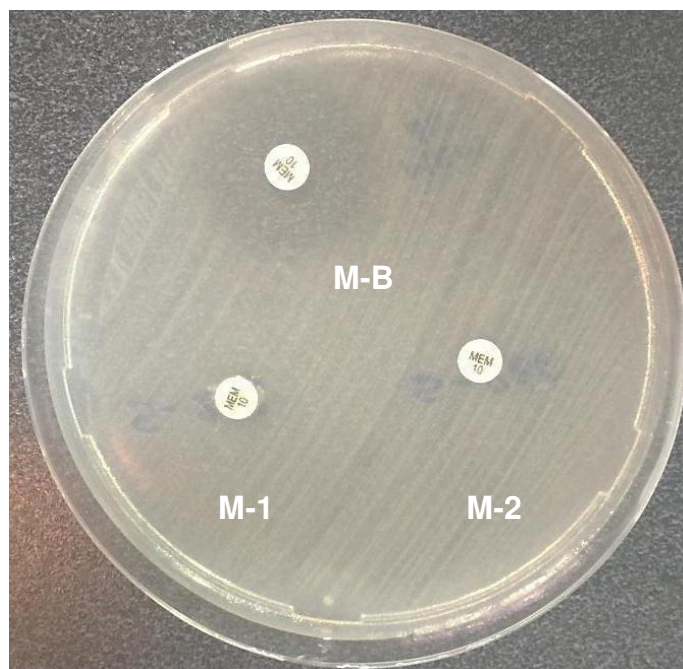


Figura 7. Prueba MIC\*. M-B: Muestra blanco (disco de meropenem sin prueba MIC\*). M-1 y M-2: Cepas productoras de carbapenemasas.

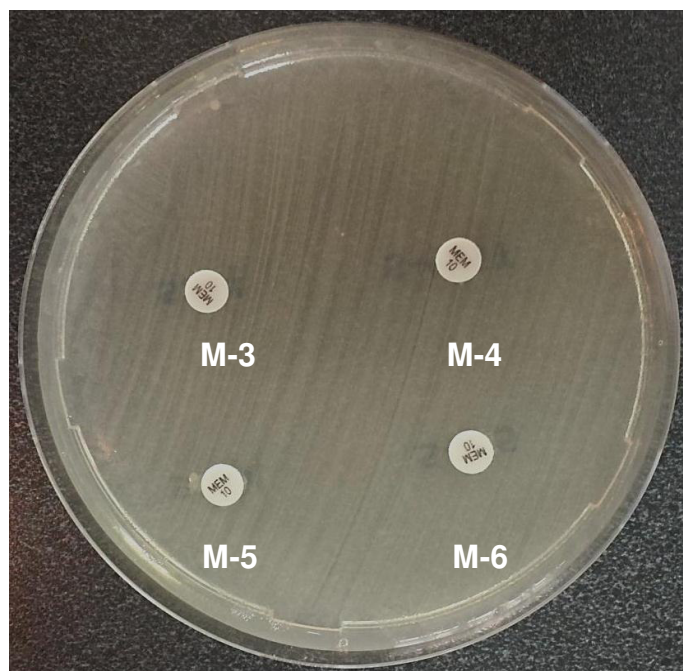


Figura 8. Prueba MIC\*. M-3, M-4, M-5 y M-6: Cepas productoras de carbapenemasas.

### 4.3 Detección genotípica

La detección de genes codificantes de las Oxacilinasas ( $bla_{OXA-23-like}$ ,  $bla_{OXA-24-like}$  y  $bla_{OXA-58-like}$ ) en las 51 cepas de *Acinetobacter baumannii* se realizó a través del PCR multiplex, reveló que 38/51 (74.5%) cepas portaban genes codificantes de Oxacilinasas (Ver tabla 6). De ellos 38/38 (100%) portaban el gen codificante para el OXA-24 y el 5/38 (13.2%) portaban además el gen codificante para el OXA-58. No se detectó el gen codificante para el OXA-23. Finalmente se realizó la determinación de la prevalencia de los genes  $bla_{OXA-23-like}$ ,  $bla_{OXA-24-like}$  y  $bla_{OXA-58-like}$  en las cepas recolectadas durante el periodo de estudio. (Ver tabla 7 y figuras 8, 9, 10, 11 y 12).

Tabla 6. Detección molecular por PCR multiplex del  $bla_{OXA-23-like}$ ,  $bla_{OXA-24-like}$  y  $bla_{OXA-58-like}$  en cepas de *Acinetobacter baumannii* a nivel genómico.

Gen	N° de aislamientos (n=51)	Porcentaje (%)
Solo $bla_{OXA-24-like}$	33	64.7
Solo $bla_{OXA-58-like}$	0	0
Solo $bla_{OXA-23-like}$	0	0
$bla_{OXA-24-like}$ + $bla_{OXA-58-like}$	5	9.8
Ausencia de genes OXA	13	25.5

Tabla 7. Prevalencia del bla<sub>OXA-23-like</sub>, bla<sub>OXA-24-like</sub> y bla<sub>OXA-58-like</sub> en cepas de *Acinetobacter baumannii* a nivel genómico.

Gen	Número (n=38)	Prevalencia (%)
bla <sub>OXA-24-like</sub>	38	100
bla <sub>OXA- 58-like</sub>	5	13.2
bla <sub>OXA-23-like</sub>	0	0

De las 38 cepas portadoras de algún gen codificante de Oxacilinasas se mostró prevalencia del gen bla<sub>OXA-24-like</sub>; seguida del bla<sub>OXA-58-like</sub>. No se detectó el gen bla<sub>OXA-23-like</sub>, sugiriendo una prevalencia baja o nula de este tipo de gen en *Acinetobacter baumannii* recolectados en dicho Hospital durante el periodo estudiado. Es importante señalar que 5 cepas portadoras de genes codificantes de Oxacilinasas presentaron los genes para OXA-24 / OXA-58.

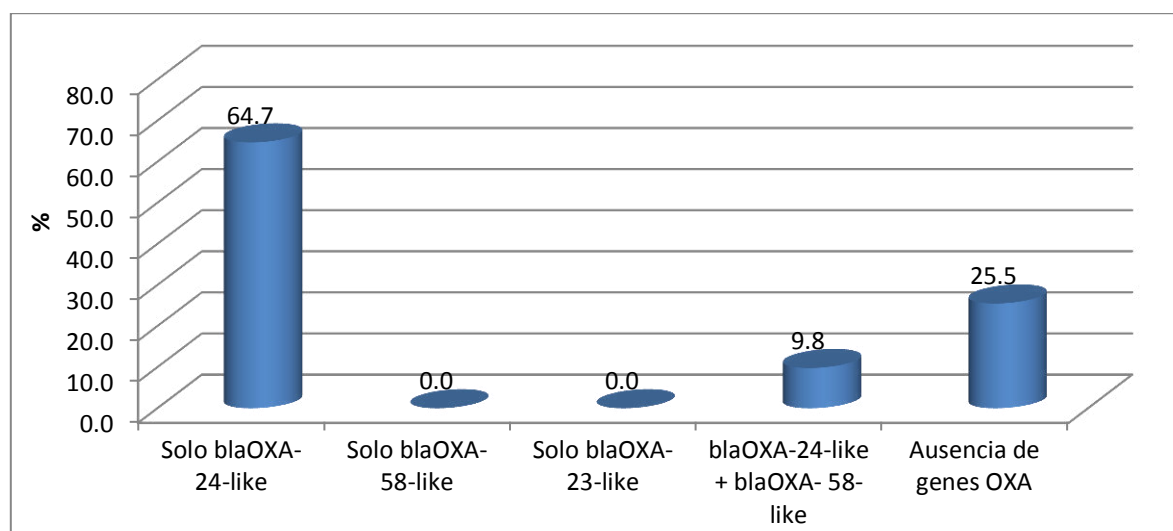


Figura 9. Distribución porcentual del bla<sub>OXA-23-like</sub>, bla<sub>OXA-24-like</sub> y bla<sub>OXA- 58-like</sub> en cepas de *Acinetobacter baumannii* a nivel genómico.

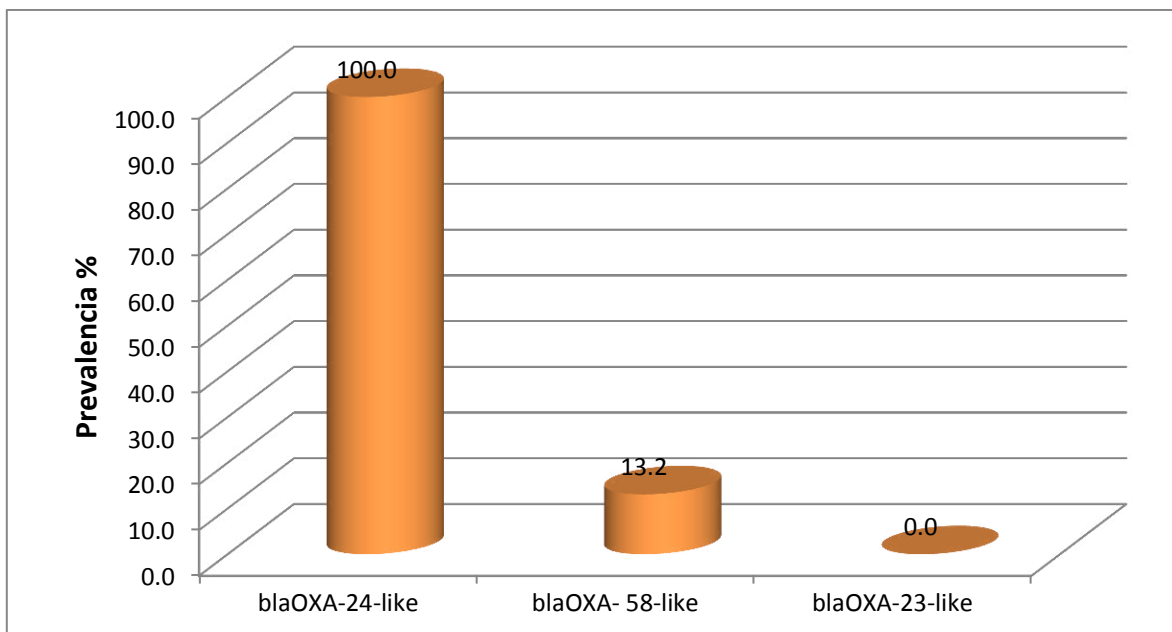


Figura 10. Prevalencia del bla<sub>OXA-23-like</sub>, bla<sub>OXA-24-like</sub> y bla<sub>OXA-58-like</sub> en cepas de *Acinetobacter Baumannii* a nivel genómico.

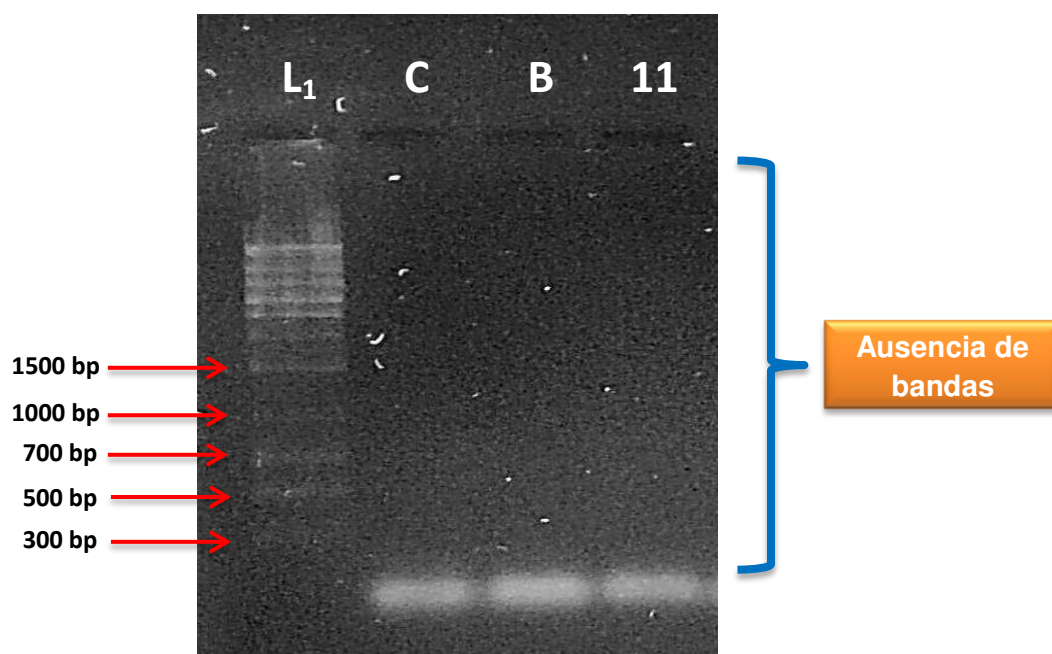


Figura 11. Electroforesis de PCR multiplex para los genes bla<sub>OXA-23-like</sub>, bla<sub>OXA-24-like</sub> y bla<sub>OXA-58-like</sub> en cepas de *Acinetobacter Baumannii*. C: Control negativo. B: Blanco. Muestra 11: Cepa negativa. L1: Ladder de 1kb.

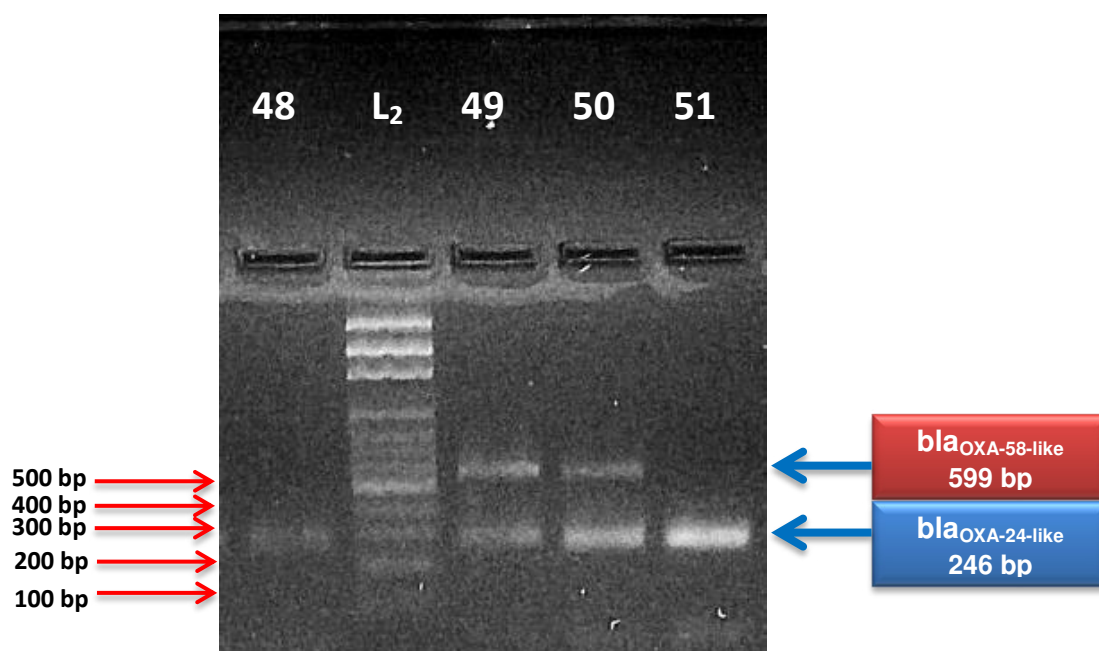


Figura 12. Electroforesis de PCR multiplex para los genes *bla*<sub>OXA-23-like</sub>, *bla*<sub>OXA-24-like</sub> y *bla*<sub>OXA-58-like</sub> en cepas de *Acinetobacter Baumannii*. Muestras 49 y 50: Cepas positivas para los genes *bla*<sub>OXA-58-like</sub> y *bla*<sub>OXA-24-like</sub>. Muestras 48 y 51: Cepas positivas para el gen *bla*<sub>OXA-24-like</sub>. L<sub>2</sub>: Ladder de 100 bp.



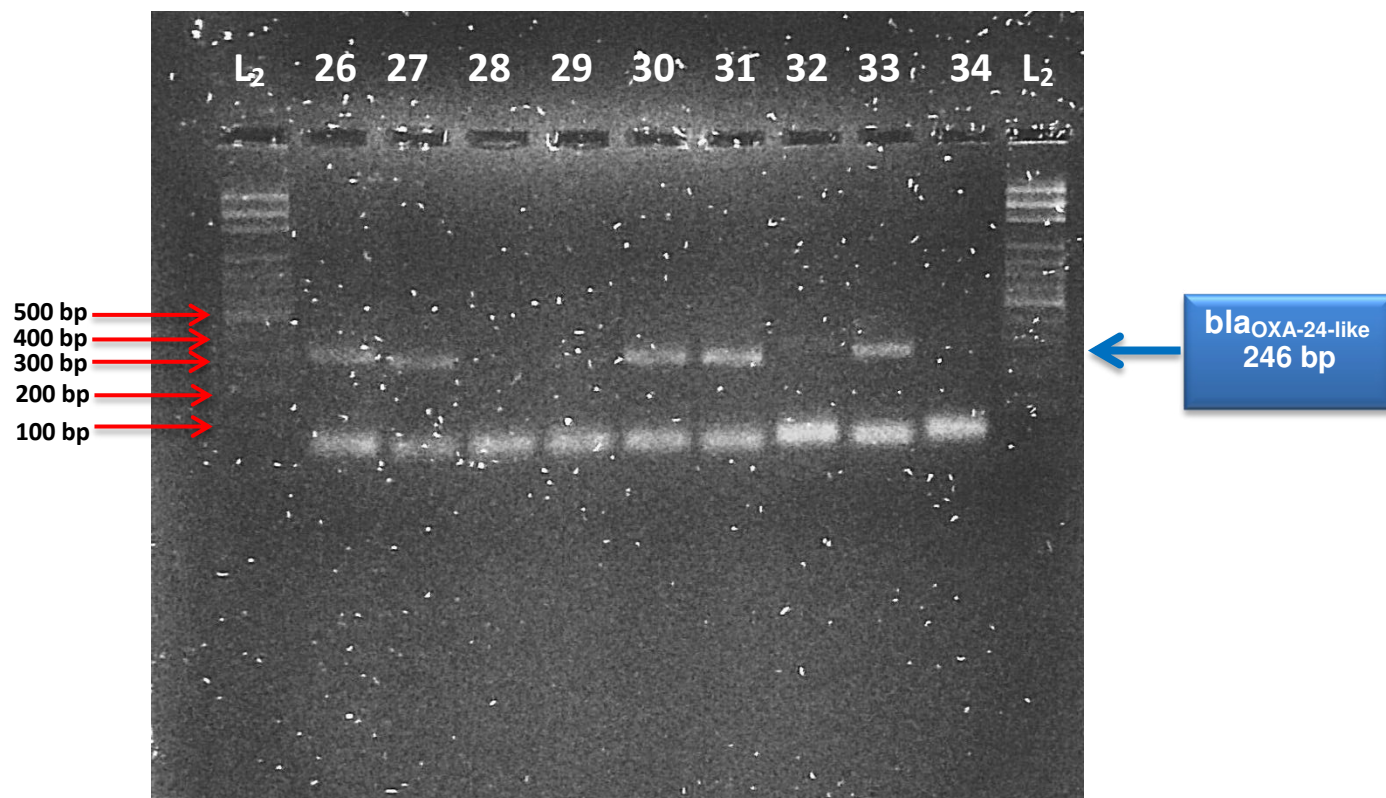


Figura 13. Electroforesis de PCR multiplex para los genes  $\text{bla}_{\text{OXA-23-like}}$ ,  $\text{bla}_{\text{OXA-24-like}}$  y  $\text{bla}_{\text{OXA-58-like}}$  en cepas de *Acinetobacter baumannii*. Muestras 26, 27, 30, 31 y 33: Cepas positivas para el gen  $\text{bla}_{\text{OXA-24-like}}$ . Muestras 28, 29, 32 y 34: Cepas negativas para los genes en estudio. L<sub>2</sub>: Ladder de 100 bp.

## V.DISCUSIÓN

En este estudio se detectó la presencia de enzimas carbapenemasas en cepas aisladas resistentes a carbapenémicos e identificados como *Acinetobacter baumannii* de un Hospital Nacional de Referencia en Lima, utilizando el método fenotípico de inactivación de los carbapenémicos (MIC\*) recomendados por Zwaluw et al. (2015) para microorganismos gramnegativos<sup>100</sup>. Este es un método de bajo costo, fácil realización y alta reproducibilidad en el laboratorio de microbiología. Diversos estudios señalan que el MIC\* puede usarse como prueba rutinaria para la detección de carbapenemasas en cepas aisladas en laboratorios clínicos con recursos limitados, asimismo esta prueba permite indicar de manera eficiente las cepas que se someterán a pruebas adicionales como PCR para una identificación detallada del gen codificador de carbapenemasa. Ya que el MIC\* muestra una alta concordancia con los resultados obtenidos con el PCR, sin embargo, el prolongado tiempo de incubación es una de sus desventajas<sup>101, 102</sup>. Es por ello que para la identificación de la presencia de genes bla<sub>OXA-23-like</sub>, bla<sub>OXA-24-like</sub> y bla<sub>OXA-58-like</sub> se utilizó la prueba de PCR multiplex.

En la prueba fenotípica de inactivación de los carbapenémicos (MIC\*), de las 51 cepas recolectadas de forma no aleatorio por conveniencia (cepas aisladas e identificadas como *Acinetobacter baumannii* con perfil de resistencia a Carbapenémicos), basada en la capacidad de la enzima carbapenemasa de hidrolizar la concentración de Meropenem contenida en un sensidisco de papel de filtro mediante la elución del mismo en agua destilada estéril<sup>95</sup>, se encontró que el 100% (51/51) de cepas recolectadas fueron positivos para la detección de

carbapenemasas. Esta prueba está validada para detectar la actividad carbapenemasa de diversas enzimas codificadas por determinados genes, entre ellos los que codifican a las enzimas OXA-23, OXA-24, OXA-58 y OXA-143, con diversos reportes de sensibilidad de 90% y especificidad del 100%. Sin embargo, la enzima OXA-51, producida naturalmente por *Acinetobacter baumannii*, parece poseer una débil actividad hidrolítica sobre los carbapenémicos debido a que no tiene ningún efecto en los resultados de la prueba MIC\* aun con un tiempo de incubación prolongado<sup>100, 101</sup>. Es por ello que se necesitan pruebas moleculares para identificar los genes productores de carbapenemasas en las cepas.

Kunling et al. (2016) evaluó el método MIC\* con 51 cepas de *Acinetobacter baumannii* portadores de los genes carbapenemasa de la clase D en la cual se reportó una detección positiva en 42/51 cepas aisladas (82.3%), faltando detectar 2 cepas aisladas productoras de los genes bla<sub>OXA-23-like</sub> y 6 de bla<sub>OXA-51-like</sub>, así como una cepa que albergó los genes bla<sub>OXA-23-like</sub> como el bla<sub>OXA-51-like</sub>. El MIC\* no identificó solo 9 de 51 cepas productoras de carbapenemasas de OXA, por lo que concluyeron que dichas cepas probablemente poseían carbapenemasas con actividad hidrolítica más débil.<sup>103</sup>

Dicho esto, se concluye que en nuestro estudio las 51 cepas recolectadas poseían carbapenemasas con alta actividad hidrolítica dando como resultado un 100% (51/51) positivo al método MIC\*.

Por otro lado, a todas las cepas recolectadas (51) se les realizó la prueba molecular de PCR multiplex como método de identificación de los genes bla<sub>OXA-23-like</sub>, bla<sub>OXA-24-like</sub> y bla<sub>OXA-58-like</sub> debida a su mayor frecuencia y diseminación en el medio hospitalario.<sup>19</sup>

Levy-Blitchtein et al. 2018 realizó un estudio en 2 hospitales del Perú (Hospital Nacional Arzobispo Loayza y el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas), en la cual identificó la presencia de genes codificantes de las OXA en CRAB, reportando una mayor frecuencia del gen bla<sub>OXA-24-like</sub>, mientras que el gen bla<sub>OXA-23-like</sub> se identificó esporádicamente con un 81.3% (65/80) y 13.8% (11/80) respectivamente. Estos datos son congruentes con nuestros resultados en el que se encontró que un 74.5% (38/51) portaban el gen bla<sub>OXA-24-like</sub> y ninguna cepa presentó el gen bla<sub>OXA-23-like</sub>. Dicho esto se podría deducir que en los hospitales de lima circula con mayor frecuencia cepas de *Acinetobacter baumannii* con genes bla<sub>OXA-24-like</sub> y en menor proporción genes bla<sub>OXA-23-like</sub>.<sup>104</sup>

Por otro lado el gen bla<sub>OXA-24-like</sub> es menos diseminado que el gen bla<sub>OXA-23-like</sub>, en América y el Caribe, pero diversos reportes indican que estos informes se están incrementado en Asia y América.<sup>15</sup> Asimismo, se ha informado que este gen causa brotes hospitalarios en muchas Unidades de Cuidados Intensivos (UCI) en todo el mundo; en Latinoamérica, los aislamientos esporádicos se describieron en Brasil y Colombia a mediados de la última década<sup>35</sup>. Rocha et al 2017, reportó la presencia del bla<sub>OXA-23-like</sub> y bla<sub>OXA-24-like</sub> en un 87% y 13% de 91 cepas de CRAB en 4 hospitales de Brasil (Grande do Sul, Rio de Janeiro, Paraná y São Paulo) lo que confirma la diseminación de bla<sub>OXA-23-like</sub> en Latinoamérica y sugieren la

reciente aparición y diseminación del gen *bla*<sub>OXA-24-like</sub><sup>105</sup>. Mientras que en México diversos autores sugieren que este gen es el responsable de la mayoría de CRAB.<sup>35</sup>

García Lucas (2016) En el hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca-España, identificó la presencia del gen *bla*<sub>OXA-24-like</sub> y del *bla*<sub>OXA-51-like</sub> en un 93.1% y 99% de 239 cepas de CRAB respectivamente, asimismo en su estudio dichas cepas no presentaron el gen *bla*<sub>OXA-23-like</sub> ni el *bla*<sub>OXA-58-like</sub>, estos datos son concordante con nuestros resultados.<sup>106</sup>

Por otro lado en nuestro estudio, se evidenció que un 9.8% (5/51) de cepas portaban el gen *bla*<sub>OXA-58-like</sub>. Esta frecuencia es mayor si lo comparamos con el 6.6% (4/60) a lo reportado por Cuaical et al. 2012 en diversos centros de salud de Caracas- Venezuela, durante el periodo de Agosto a Diciembre del 2008.<sup>107</sup> Asimismo en el Hospital Estadual Azevedo Lima ubicado en Rio de Janeiro – Brasil, Quaresma et al. 2011, en el periodo de Octubre - 2005 a Junio - 2006 reportó que el 5% (1/20) de cepas de *Acinetobacter baumannii* presentaban el gen *bla*<sub>OXA-58-like</sub>, este estudio fue el primer reporte de presencia del *bla*<sub>OXA-58-like</sub> en aislamientos clínicos de *Acinetobacter baumannii* en Brasil.<sup>108</sup>

Por otro lado, en el Hospital de Clínicas Dr. Manuel Quintela, Uruguay; se detectó los genes asociados a la resistencia mediante PCR de 78 CRAB, de las cuales todas presentaban el gen *bla*<sub>OXA-51-like</sub>; 62/78 (79.5%) albergaban el gen *bla*<sub>OXA-23-like</sub> y 3/78 (3.8%) portaba el gen *bla*<sub>OXA-58-like</sub>; finalmente ninguna cepa aislada portaba genes KPC ni NDM.<sup>109</sup>

Aunque diversos estudios señalan que el bla<sub>OXA-23-like</sub>, es el gen más frecuente en cepas de CRAB en América del Sur <sup>89,90</sup>. Rodriguez, et al. Señalan que el gen bla<sub>OXA-58-like</sub>, está remplazando progresivamente la frecuencia de la presencia del bla<sub>OXA-23-like</sub> en los últimos años en Latinoamérica, asimismo; estudios en Bolivia y Chile reportaron que la presencia del gen bla<sub>OXA-58-like</sub> era el responsable de la resistencia a carbapenémicos en brotes de CRAB. <sup>35,110</sup>.

La variación de la frecuencia de genes codificantes de los bla<sub>OXA-23-like</sub>, bla<sub>OXA-24-like</sub> y bla<sub>OXA-58-like</sub> es variable en los diferentes hospitales, debido a la epidemiología en cada hospital, en las que los elementos genéticos móviles tales como plásmidos e integrones desempeñar un papel fundamental que facilita la diseminación de estos genes. <sup>15</sup>

## VI. CONCLUSIONES

En el 100% (51/51) de las cepas recolectadas de *Acinetobacter baumannii* resistentes a carbapenémicos de un Hospital Nacional de referencia en Lima durante el periodo diciembre del 2017 – marzo del 2018 se detectaron fenotípicamente las enzimas carbapenemasas.

Se determinó a través del PCR múltiplex que 38/51 (74.5%) cepas portaban genes codificantes de bla<sub>OXA-24-like</sub> y bla<sub>OXA-58-like</sub>. No se detectó la presencia de genes codificantes bla<sub>OXA-23-like</sub>.

Los genes bla<sub>OXA-24-like</sub> fueron los más prevalentes con un 100% (38/38) de todos las cepas de *Acinetobacter baumannii* portadoras de genes codificantes de Oxacilinasas, mientras que el 13.2% (5/38) fueron para el gen bla<sub>OXA-58-like</sub>.

## VII. RECOMENDACIONES

Se recomienda que todos los aislamientos con perfil de resistencia a carbapenémicos sean evaluados de forma rutinaria para determinar la posible presencia de enzimas oxacilinasas, utilizando métodos fenotípicos; ya que la detección temprana de *Acinetobacter baumannii* productoras de oxacilinasas permitirá a las Autoridades del ámbito de Salud implantar acciones de control con el fin de evitar la propagación de cepas de *Acinetobacter baumannii* multirresistentes hacia otros pacientes.

Investigar la presencia de genes codificantes de otras carbapenemasas diferentes a lo estudiado tales como la clase A (KPC, GES) y clase B (IMP, VIM, NDM, SIM) también reportadas en cepas de *Acinetobacter baumannii* multirresistente, esta información permitirá mejorar la vigilancia y control de estas bacterias, contribuyendo a la toma de la mejor decisión en cuanto a la administración de los antibióticos, reducir costos y disminuir la estancia de hospitalización de los pacientes.



## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Instituto Nacional de Salud. Plan Nacional para enfrentar la resistencia a los antimicrobianos 2017 – 2021. [Internet]. 2017 [Citado el 14 de Agosto del 2017]. Disponible en:[http://antimicrobianos.ins.gob.pe/images/contenido/plan-nacional/Plan\\_Nacional\\_de\\_lucha\\_contra\\_la\\_resistencia\\_a\\_los\\_antimicrobianos\\_2017\\_2021.pdf](http://antimicrobianos.ins.gob.pe/images/contenido/plan-nacional/Plan_Nacional_de_lucha_contra_la_resistencia_a_los_antimicrobianos_2017_2021.pdf)
2. Maguiña C. Infecciones nosocomiales. Acta Med Perú.2016; 33(3):175-177.
3. Kuang L, Chen S, Chich K, Cheing C, Ying P, Hui C, et al. Clinical Antibiotic-resistant *Acinetobacter baumannii* Strains with Higher Susceptibility to Environmental Phages than Antibiotic sensitive Strains. Scientific Reports.2017; 7(1): 6319-6329.
4. Vanegas J, Higueta L, Vargas C, Cienfuegos A, Rodríguez E, Roncancio G, et al. *Acinetobacter baumannii* resistente a carbapenémicos causante de osteomielitis e infecciones de la piel y los tejidos blandos en hospitales de Medellín, Colombia. Biomédica.2015; 35(4):522-530.
5. Lee C, Lee J, Park M, Park K, Bae K, Kim Y, et al. Biology of *Acinetobacter baumannii*: Pathogenesis, Antibiotic Resistance Mechanisms, and Prospective Treatment Options. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. 2017; 7(55):1-35.
6. Saranathan R, Sudhakar P, Uma R, Kumar S, Shashikala P, Kanungo R, et al. Multiple drug resistant carbapenemases producing *Acinetobacter baumannii* isolates harbours multiple R-plasmids. Indian J Med Res. 2014; 140(2): 262–270.

7. Poirel L, Nordmann P. Carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: mechanisms and epidemiology. Clin Microbiol Infect.2006; 12(9):826-836.
8. Opazo A, Domínguez M, Bello H, Amyes S, González G. OXA- type carbapenemases in *Acinetobacter baumannii* in South America. J Infect Dev Ctries. 2012; 6(4):311-316.
9. Mugnier P, Bindayna K, Poirel L, Nordmann P. Diversity of plasmid- mediated carbapenem-hydrolysing oxacillinases among carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from Kingdom of Bahrain. J Antimicrob Chemother.2009; 63(5):1071-1073.
10. Shazly S, Dashti A, Vali L, Bolaris M, Ashraf I. Molecular Epidemiology and Characterization of Multiple-Drug Resistant (MDR) Clinical Isolates of *Acinetobacter baumannii*. Int J Infect Dis. 2015; 41(1):42-49.
11. Cordeiro F, Clemente W, Lincopan N, Clinical and microbiological characteristics of OXA-23- and OXA-143-producing *Acinetobacter baumannii* in ICU patients at a teaching hospital, Brazil. braz j infect dis. 2016;20(6):556-563.
12. Falagas M, Karvely E. The changing global epidemiology of *Acinetobacter baumannii* infections: a development with major public health implications. Clin Microbiol Infect. 2007; 13(1): 117-119.
13. Codjoe F, Donkor E. Carbapenem Resistance: A Review. Med. Sci. 2018; 6(1):1-28.
14. Nicolau C, Oliver A. Carbapenemasas en especies del género *Pseudomonas*. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2010; 28(1):19-28.

15. Escandón K, Reyes S, Gutiérrez S, Villegas M. The epidemiology of carbapenemases in Latin America and the Caribbean. *Expert Review of Anti-infective Therapy* .2017; 15(3): 277-297.
16. Warner W, Kuang S, Hernandez R, Chong M, Ewing P, Fleischer J, et al. Molecular characterization and antimicrobial susceptibility of *Acinetobacter baumannii* isolates obtained from two hospital outbreaks in Los Angeles County, California, USA. *BMC Infectious Diseases* .2016; 16(1):194-207.
17. Raible K, Sen B, Law N, Bias T, Emery C, Ehrlich G, et al. Molecular characterization of  $\beta$ -lactamase genes in clinical isolates of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Clin Microbiol Antimicrob*.2017; 16(1):75-85.
18. Glasner C, Grundmann H, Pelagia A, Högberg L, Monnet D, Albiger B. et al. Carbapenemase-producing bacteria in Europe. European Centre for Disease Prevention and Control. Europa; 2013. Report N°: TQ-01-13-572-EN-N.
19. European Centre for Disease Prevention and Control. Carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii* in healthcare settings .Stockholm: ECDC; 2016.
20. Nowak J, Zander E, Stefanik D, Higgins P, Roca I, Vila J, et al. High incidence of pandrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates collected from patients with ventilator-associated pneumonia in Greece, Italy and Spain as part of the MagicBullet clinical trial. *J Antimicrob Chemother*.2017; 72(12): 3277–3282.
21. Merino M, Poza M, Roca I, Barba MJ, Sousa MD, Vila J, et al. Nosocomial outbreak of a multiresistant *Acinetobacter baumannii* expressing OXA-23

- carbapenemase in Spain. Microbial drug resistance (Larchmont, NY). 2014; 20(4):259-263.
22. Yang D, Liang H, Gao H, Wang X, Wang Y. Carbapenem Resistant *Acinetobacter baumannii* and Enterobacteriaceae in South and Southeast Asia. Clinical Microbiology Reviews.2017;30(1):1-22.
  23. Zhi Ning N. Molecular epidemiology of blaOXA-23- producing carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in a single institution over a 65-month period in north China. BMC Infectious Diseases.2017; 17(1):1-8.
  24. Han L,PHD, Lei J,MMed, Xu J, Han S. bla<sub>OXA-23</sub>-like and bla<sub>TEM</sub> rather than bla<sub>OXA-51-like</sub> contributed to a high level of carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii* strains from a teaching hospital in Xi'an, China. Han et al. Medicine.2017; 96(1):48-53.
  25. Yang D, Liang H, Gao H, Wang X. Analysis of drug-resistant gene detection of blaOXA-like genes from *Acinetobacter baumannii*. Genet. Mol. Res.2015; 14 (4): 18999-19004.
  26. Ma Z, Zhou L, Wang H, Luo L. Investigations on the genomic diversity of OXA from isolated *Acinetobacter baumannii*. Genet. Mol. Res.2015; 14 (4): 14711-14716.
  27. Al Atroun A, Hamze M, Jisr T, Lemari C. Wide spread of OXA-23-producing carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii* belonging to clonal complex II in different hospitals in Lebanon. International Journal of Infectious Diseases .2016;52: 29–36.
  28. Handal R, Qunibi L, Sahouri I, Juhari M, Dawodi R, Marzouqa H, Hindiye M. Characterization of Carbapenem Resistant *Acinetobacter baumannii* Strains

Isolated from Hospitalized Patients in Palestine. International Journal of Microbiology. 2017.

29. Rezaei A, Fazeli H, Moghadampour M, Halaji M, Faghri J. Determination of antibiotic resistance pattern and prevalence of OXA-type carbapenemases among *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from inpatients in Isfahan, central Iran. Le Infezioni in Medicina. 2018; 26(1):61-66.
30. Mohammad D, Mahmoud M, Hamed M, Alyamani, E, Booq R, Almoazzamy O. The emergence of a novel sequence type of MDR *Acinetobacter baumannii* from the intensive care unit of an Egyptian tertiary care hospital. Clin Microbiol Antimicrob .2017; 16:34-41.
31. Hu Y, Hou C, Kuo C, Wang N, Wu AY, Leung C, et al. Emergence of carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii* ST787 in clinical isolates from blood in a tertiary teaching hospital in Northern Taiwan, Journal of Microbiology, Immunology and Infection .2017; 50(5):640-645.
32. Ladavac R, Bedenić B, Vranić-Ladavac M, Barišić N, Karčić N, Pompe K, et al. Emergence of different *Acinetobacter baumannii* clones in a Croatian hospital and correlation with antibiotic susceptibility. J Glob Antimicrob Resist. 2017; 10(1):213-218.
33. Bakour S, Alsharapy S, Touati A, Rolain J. Characterization of *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolates Carrying blaOXA-23 Carbapenemase and 16S rRNA Methylase armA genes in Yemen. Microbial Drug Resistance. 2014; 20(6): 604-609.
34. Rolain J, Loucif L, Maslamani A, Elmagboul M, E., Ansari A, Taj-Aldeen N, et al. Emergence of multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* producing

- OXA-23 Carbapenemase in Qatar. *New Microbes and New Infections*. 2016; 11:47–51.
35. Rodríguez C, Nastro M, Famiglietti A. Carbapenemases in *Acinetobacter baumannii*. Review of their dissemination in Latin America. *Rev Argent Microbiol*. 2018; 17(1):1-7.
36. Villegas M, Kattan J, Correa A. *Acinetobacter baumannii* con carbapenemasa OXA-23 en Colombia. *Rev Chil Infect* 2007; 24 (6): 503-503.
37. Rocha L, Pagano M, Campos J, Sampaio J, Martins A, Barth A, et al. Carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii* in Brazil: susceptibility profile and diversity of oxacilinasas. *J Bras Patol Med Lab*. 2017; 53(6): 358-361.
38. Nuñez T, Rodríguez C, Castro G, Nastro M, Balderrama N, Dabos L, et al. Outbreak of bla<sub>OXA-72</sub> producing *Acinetobacter baumannii* in South America. *J Chemother*. 2017; 29(5):321-324.
39. Merkie A, Catalano M, Ramírez M, Quiroga C, Orman B, Ratier L, et al. Polyclonal spread of bla<sub>OXA-23</sub> and bla<sub>OXA-58</sub> in *Acinetobacter baumannii* isolates from Argentina. *Infect Developing Countries*. 2008; 2(3):235-240.
40. Lopes B, Gallego L, Amyes S. Multi drug resistance profiles and the genetic features of *Acinetobacter baumannii* isolates from Bolivia. *J Infect Dev Ctries*. 2013; 7(4):323-328.
41. Meza Pacheco A. “Aislamiento y caracterización de bacteriofagos para cepas nosocomiales de *Acinetobacter baumannii* DE LIMA E IQUITOS, PERÚ 2014 - 2015”. [Tesis de Título Profesional]. Arequipa. Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas .Universidad Católica Santa María 2016.

42. Gastelo R, Díaz R, Maguiña C. Carbapenemasas en bacterias Gram negativas no fermentadoras aisladas en servicios críticos del Hospital Regional de Lambayeque, diciembre 2014 – julio 2015. *Acta Med Peru.* 2016; 33(3):183-188.
43. Brisou J, Prevot A. Studies on bacterial taxonomy. X. The revision of species under *Acromobacter* group. *Ann Inst Pasteur.* 1954; 86:722-728; PMID: 13197842.
44. Baumann P, Doudoroff M, Stanier R. A study of the *Moraxella* group. II. Oxidative negative species (genus *Acinetobacter*). *J Bacteriol.* 1968; 95(5):1520-1541.
45. Peleg A, Seifert H, Paterson D. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clin Microbiol Rev.* 2008; 21(3):538-582.
46. Lessel E. Subcommittee on nomenclature of *Moraxella* and allied bacteria. *Int J Syst Bacteriol.* 1971; 21(1):213-214.
47. Álvarez L. Caracterización de nuevos factores de virulencia del patógeno nosocomial *Acinetobacter baumannii*. (Tesis doctoral en Biología Celular y Molecular). Universidad de A Coruña, Enero 2018.
48. Nemec A. Classification and nomenclature of *Acinetobacter* spp. *Státní zdravotní ústav.* 2018.
49. Vanegas J, Roncancio G, Jiménez J. *Acinetobacter baumannii*: importancia clínica, mecanismos de resistencia y diagnóstico. *Rev CES Med.* 2014; 28(2): 233-246.
50. Bocanegra P. Caracterización fenotípica y molecular de aislamientos clínicos de *Acinetobacter baumannii* obtenidos en un hospital de tercer nivel en

nuevo león. [Tesis Maestro en Ciencias con orientación en microbiología medica]. México: Universidad Autónoma de Nueva León, 2013.

51. Almasaudi S. *Acinetobacter spp.* as nosocomial pathogens: Epidemiology and resistance features. Saudi Journal of Biological Sciences. 2018; 25 (3); 586-596.
52. Talbot G, Bradley J, Edwards J, Gilbert D, Scheld M, Bartlett J. Bad bugs need drugs: an update on the development pipeline from the Antimicrobial Availability Task Force of the Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis. 2006; 42(5):657-668.
53. Spellberg B, Guidos R, Gilbert D, Bradley J, Boucher HW, Scheld WM, et al. The epidemic of antibiotic-resistant infections: a call to action for the medical community from the Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis. 2008; 46(2):155-164.
54. Boucher HW, Talbot GH, Bradley JS, Edwards JE, Gilbert D, Rice LB, et al. Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis. 2009; 48(1):1-12.
55. Organización Mundial de la Salud. La OMS publica la lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos [Internet]. 2017 [Citado el 28 de Agosto del 2017]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/bacteria-antibiotics-needed/es/>
56. Dirección ejecutiva de epidemiología. Bacterias que necesitan urgentemente nuevos antibióticos. Boletín epidemiológico semanal, Diresa, Tacna - Perú. 2017; Vol.07:1-9.



57. Martínez E, Sánchez L, Rodríguez G. *Acinetobacter baumannii*, un patógeno emergente: estudio prospectivo en una unidad de terapia intensiva respiratoria. Rev Asoc Mex Med Crit Ter Int. 2016; 30(3):187-191.
58. Rodríguez R, Bustillo D, Caicedo D, Cadena D, Castellanos C. *Acinetobacter baumannii*: patógeno multirresistente emergente. MED.UIS. 2016; 29(2):113-135.
59. Grupper M, Sprecher H, Mashiach T, Finkelstein R. Attributable mortality of nosocomial *Acinetobacter* bacteremia. Infect Control Hosp Epidemiol. 2007; 28(3):293-298.
60. Cornistein W. Manejo de las infecciones por organismos multirresistentes, infecciones por *Acinetobacter baumannii*. Sociedad argentina de terapia intensiva, comité de infectología crítica. 2009; 1-16.
61. Aguirre G, Mijangos J, Amaya G. Bacteriemia por *Acinetobacter baumannii*. Rev Med Inst Mex Seguro Soc. 2010; 48 (6): 625-634.
62. Falagas M, Vardakas K, Kapaskelis A, Triarides N, Roussos N. Tetracyclines for multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*. infections. Int J Antimicrob Agents. 2015; 1-6.
63. Ni S, Li S, Yang N, Zhang S, Hu D, Li Q, Lu M. Post neurosurgical meningitis caused by *Acinetobacter baumannii*: case series and review of the literatura. Int J Clin Exp Med. 2015; 8(11):21833-21838.
64. Rada J. *Acinetobacter* un patógeno actual. Rev Soc Bol Ped. 2016; 55 (1): 29-48.
65. Longo F, Vuotto C, Donelli G. Biofilm formation in *Acinetobacter baumannii*. New Microbiologica. 2014; 37:119-127.

66. Gaddy J, Actis L. Regulation of *Acinetobacter baumannii* biofilm formation. *Future Microbiol.* 2009; 4: 273–278.
67. Zuñiga A, Tobar F, Duque J, Moreno P. *Acinetobacter baumannii*: Resistencia y Virulencia mediada por el Sistema de Secreción Bacteriano Tipo IV. *Revista estomatol, salud.* 2013; 21(2):37-45.
68. Barletta R, Pérez L, Castro G, Pujol M, Barletta J, Dueñas Y. *Acinetobacter baumannii* multirresistente: un reto para la terapéutica actual. *Medisur.* 2018; 16(2): 322-334.
69. Jacobs A, Hood I, Boyd K, Olson P, Morrison J, Carson S, et al. Inactivation of phospholipase D diminishes *Acinetobacter baumannii* pathogenesis. *Infect Immun.* 2010; 78(5):1952–1962.
70. Howard A, Michael O'Donoghue M, Feeney A, Sleator R. *Acinetobacter baumannii*, an emerging opportunistic pathogen. *Virulence.* 2012; 3:3, 243-250.
71. Camarena L, Bruno V, Euskirchen G, Poggio S, Snyder M. Molecular mechanisms of ethanol-induced pathogenesis revealed by RNA sequencing. *PLoS Pathog.* 2010; 6(4):e1000834.
72. Moon D, Choi C, Lee J, Choi C, Kim H, Park J, et al. *Acinetobacter baumannii* outer membrane protein A modulates the biogenesis of outer membrane vesicles. *J Microbiol.* 2012; 50(1):155-160.
73. Jun S, Lee J, Kim B, Kim S, Park T, Lee J, et al. *Acinetobacter baumannii* Outer Membrane Vesicles Elicit a Potent Innate Immune Response via Membrane Proteins. *PLoS ONE.* 2013; 8(8): e71751.

74. Lin M, Lan C. Antimicrobial resistance in *Acinetobacter baumannii*: From bench to bedside. *World J Clin Cases*. 2014; 2(12): 787-814.
75. Nowak P, Paluchowska P; *Acinetobacter baumannii*: biology and drug resistance - role of carbapenemases. *Folia Histochem Cytobiol*. 2016; 54(2):61-74.
76. Asif M, Alvi I, Rehman S. Insight into *Acinetobacter baumannii*: pathogenesis, global resistance, mechanisms of resistance, treatment options, and alternative modalities. *Infection and Drug Resistance*. 2018;11 1249–1260.
77. Gordona N, Wareham D. Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*: mechanisms of virulence and resistance. *International Journal of Antimicrobial Agents* 35. 2010; 219-226.
78. Moreno K. Carbapenémicos: tipos y mecanismos de resistencia bacterianos. *Revista médica de Costa Rica y Centroamérica lxx*. 2013; (608) 599-605.
79. Mobasser P, Azimi L, Salehi M, Hosseini F, Fallah F. Distribution and Expression of Efflux Pump Gene and Antibiotic Resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Arch Clin Infect Dis*. In Press: e67143.
80. Coyne S, Courvalin P, Périchon B. Efflux mediated antibiotic resistance in *Acinetobacter* spp. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010; 55(3):947-953.
81. Rizzo C, Marascio N, Zicca E, Pavia G, Quirino A, Lamberti A, et al. Efflux Pump AdeABC Assessment in *Acinetobacter baumannii* Strains Isolated in a Teaching Hospital. *J Med Microb Diagn*. 2016; 5: 237.
82. Opazo A, Mella S, Domínguez M, Bello H, González G. Bombas de expulsión multidroga en *Acinetobacter baumannii* y resistencia a antimicrobianos. *Rev Chil Infect* 2009; 26 (6): 499-503.

83. Lorente R. Ureas derivadas de 2-amino-1,3-propanodiol y 1,3- diamino-2-propanol con potencial actividad antibacteriana. Síntesis y caracterización estructural [Trabajo fin de grado]. Sevilla: Universidad de Sevilla, Departamento de Química Orgánica y Farmacéutica, 2017.
84. Cayô R, Rodríguez M, Espinal P, Cuenca F, Ocampo A, Pascual A, et al. Analysis of genes encoding penicillin binding proteins in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother. 2011; 55(12):5907-5913.
85. Vashist J, Tiwari V, Das R, Kapil A, Rajeswari M. Analysis of penicillin binding proteins (PBPs) in carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii*. Indian J Med Res 133. 2011; 332-338.
86. Poirel L, Figueiredo S, Cattoir V, Carattoli A, Nordmann P. *Acinetobacter radioresistens* as a silent source of carbapenem resistance for *Acinetobacter* spp. Antimicrob Agents Chemother. 2008; 52:1252-1256.
87. Segal H, Garny S, Elisha B. Is IS (ABA-1) customized for *Acinetobacter*. FEMS Microbiol Lett. 2005; 243:425-429.
88. Pagano M, Martins A, Barth A. Mobile genetic elements related to carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. Brazilian Journal of microbiology. 2016; 47(4):785-792.
89. Fonseca E, Freitas F, Scheidegger E, Jacinto T, Vicente A. Class 2 integrons in multidrug resistant *Acinetobacter baumannii* circulating in different Brazilian geographic regions. Int J Antimicrob Agents. 2011; 38:95-96.

90. Instituto Nacional de Salud (INS). Manual de Procedimientos Bacteriológicos en Infecciones Intrahospitalarias. Serie de Normas Técnicas N°28. 2001; Lima, Perú.
91. Salazar de Vegasa E, Nieves B. *Acinetobacter* spp.: Aspectos microbiológicos, clínicos y epidemiológicos. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología, vol. 25, N°2. 2005; 178- 191.
92. MacFaddin J. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Editorial médica panamericana. 2003; 3: 596.
93. Clinical & Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, Disk diffusion and MIC testing. M100, 28th ed. 2018.
94. Instituto Nacional de Salud (INS). Manual de Procedimientos para la prueba de Sensibilidad Antimicrobiana por el método de Disco de Difusión. Serie de Normas Técnicas N°30. 2002; Lima, Perú.
95. Reyes J, Villacís J, Chicaiza S, Satán C, Salas S, Ushiña L, *et al.* Inactivación del carbapenémico, un método alternativo para detectar carbapenemasa tipo KPC en Enterobacteriaceae. Infectio. 2017; 21(4): 251-254.
96. Tijet N, Melano R. Detection of carbapenemase activity in Enterobacteriaceae: comparison of the carbapenem inactivation method versus the Carba NP test. Antimicrob Chemother. 2016; 71(1):274-276.
97. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Modified Carbapenem Inactivation

Method for Suspected Carbapenemase Production in *Enterobacteriaceae*.  
27th ed. 2017.

98. Vivantis. Bacterial DNA Extraction Kit- versión 03. [Internet] [Citado el 05 de enero del 2018]. Disponible en:  
<http://www.vivanttechnologies.com/images/Resources/roomtempmanual/gf%201%20bacterial%20dna%20extraction%20kit.pdf>.
99. Mostachio A, Heidjen I, Rossi F, Levin A, Costa S. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding oxacillinases and metallo  $\beta$ -lactamases in carbapenem resistant *Acinetobacter spp.* Journal of Medical Microbiology. 2009; 58(11):1522-1524.
100. Zwaluw K, Haan A, Pluister G, Bootsma H, Neeling A, Schouls L. The Carbapenem Inactivation Method (CIM), a Simple and Low Cost Alternative for the Carba NP Test to Assess Phenotypic Carbapenemase Activity in Gram Negative Rods. PLoS ONE. 2015; 10(3): e0123690.
101. Aktas E, Malkoçoğlu G, Otlı B, Çopur A, Külâh C, Cömert F, et al. Evaluation of the Carbapenem Inactivation Method for Detection of Carbapenemase Producing Gram Negative Bacteria in Comparison with the RAPIDEC CARBA NP. Microbial Drug Resistance. 2017; 23(4):457-461.
102. Bandyopadhyay M, Sengupta A, Mohiruddin S, Mukhopadhyay P, Kumar M, Chatterjee A, et al. A Comparison of Rapid Phenotypic Tests for The Identification of Carbapenemase Production in Gram Negative Isolates. IOSR Journal of Dental and Medical Sciences. 2017; 16(12): 90-93.

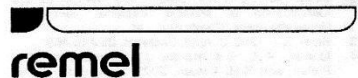
103. Sun K, Xu X, Yan J, Zhang L. Evaluation of Six Phenotypic Methods for the Detection of Carbapenemases in Gram Negative Bacteria With Characterized Resistance Mechanisms. *Ann Lab Med.* 2017; 37(4):305-312.
104. Blitchtein S, Roca I, Plasencia S, Vicente W, Velásquez J, Muñoz L, et al. Emergence and spread of carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii* international clones II and III in Lima, Perú. *Microbes & Infections.* 2018; 7:119.
105. Rocha L, Pagano M, Campos J, Sampaio J, Martins A, Barth A. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Brazil: susceptibility profile and diversity of oxacillinases. *J Bras Patol Med Lab;* 2017. 53 (6): 358-361.
106. García T. Estudio de la Epidemiología Molecular y Resistencia Antibiótica de Aislamientos Clínicos de *Acinetobacter baumannii* del Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca. [Memoria para optar al grado de Doctor, en el Área de Microbiología Clínica]. Murcia: Universidad De Murcia, Facultad De Biología. 2016.
107. Cuaical N. Detección de carbapenemasas tipo OXA en aislados de *Acinetobacter baumannii* de diferentes centros hospitalarios de Caracas, Venezuela. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología.* 2012; 32:95-100.
108. Quaresma D, Netto K, Menezes E, Pinto R, Rezende C, Martins L, et al. First report of the blaOXA-58 gene in a clinical isolate of *Acinetobacter baumannii* in Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.* 2011; Vol. 106(3): 368-370.

109. Bado Inés, Papa-Ezdra Romina, Delgado José, Gaudio Micaela, Gutierrez Claudia, Cordeiro Nicolás, et al. Molecular Characterization of Carbapenem Resistant *Acinetobacter baumannii* in the Intensive Care Unit of Uruguay's University Hospital Identifies the First rmtC Gene in the Species. *Microb Drug Resist.* 2018; 24(7):1012-1019.
110. Hernán C, Balderrama N, Nastro M, Nuñez T, Castro G, Magne R, Ugarte T, et al. Molecular epidemiology of carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii* in South America, *Journal of Medical Microbiology.* 2016; 65(1):1088-1091.



## IX. ANEXOS

### ANEXO N°1



#### BactiDrop™ Oxidase (Español)

**USO PREVISTO**  
BactiDrop™ Oxidase de Remel está recomendada en procedimientos cualitativos, para la detección de la enzima citocromo oxidasa.

**RESUMEN Y EXPLICACIÓN**  
La prueba de oxidasa se diseñó originalmente para identificar todas las especies de *Neisseria*, pero después se utilizó para separar *Pseudomonadaceae* de *Enterobacteriaceae* oxidasa negativas.<sup>1,2</sup> La mayoría de las bacterias grampositivas son oxidasa negativas y muchos de los bacilos gramnegativos, aparte de *Enterobacteriaceae*, son variables.<sup>3</sup> Esta formulación se basa en la fórmula del reactivo oxidasa de Kovacs.<sup>1</sup>

**PRINCIPIO**  
La prueba de oxidasa se basa en la producción bacteriana de una enzima oxidasa intracelular. La reacción de oxidasa se debe a la presencia de un sistema citocromo oxidasa que activa la oxidación de citocromo reducido con oxígeno molecular, que a su vez actúa como aceptor de electrones en la etapa terminal del sistema de transferencia de electrones. Los microorganismos que producen enzima oxidasa, en presencia de oxígeno atmosférico, citocromo C y reactivo fenilendiamina oxidasa, dan una reacción de oxidación para formar un compuesto de color púrpura, indofenol. El ácido ascórbico se incorpora en el reactivo como agente reductor, para reducir la autooxidación y mejorar la estabilidad.<sup>3</sup>

**REACTIVOS (FÓRMULA CLÁSICA)\***  
N,N,N,N-tetrametil-1,4-fenilenediamina  
(CAS 100-22-1) .....10,0 g  
Ácido ascórbico (CAS 50-81-7) .....2,0 g  
Agua desmineralizada (CAS 7732-18-5) .....1000,0 ml

\*Ajustado según necesidades para cumplir los estándares de funcionamiento.

**PRECAUCIONES**  
Este producto sólo es para uso diagnóstico *in vitro* y debe ser utilizado por personal con la formación adecuada. Se tomarán precauciones frente a los riesgos microbiológicos, esterilizando correctamente las muestras, envases y medios después de su uso. Se deben leer y seguir atentamente las instrucciones.

**ALMACENAMIENTO**  
Este producto está listo para su uso y no se necesita más preparación. Guardar el producto en su envase original a 20-25°C hasta que se use. No congelar ni sobrecalentar. Protegerlo de la luz.

**DETERIORO DEL PRODUCTO**  
Este producto no debe utilizarse si (1) hay pruebas de deshidratación, (2) el color ha cambiado, (3) la fecha de caducidad ha pasado o (4) hay otros signos de deterioro. La fecha de caducidad se refiere a este producto cuando está en su envase intacto y se almacena según las instrucciones. Desechar la porción restante de la ampolla parcialmente utilizada al final del día de trabajo.

**OBTENCIÓN, ALMACENAMIENTO Y TRANSPORTE DE LAS MUESTRAS**  
Las muestras se deben usar y manipular de acuerdo con las siguientes recomendaciones.<sup>4</sup>

**MATERIALES NECESARIOS PERO NO SUMINISTRADOS**  
(1) Asa para esterilización, (2) asa de inoculación, torunda y envases para recogidas, (3) incubadoras, sistemas ambientales alternativos, (4) medio complementario, (5) microorganismos para el control de calidad, (6) papel de filtro Whatman (N° 1) o equivalente, y (7) asa o aguja de platino o varilla aplicadora de madera.

**PROCEDIMIENTO**  
Colocar el cuentagotas en el triturador de la ampolla reutilizable, que se suministra ya montado. Mantener el cuentagotas/triturador en posición vertical y golpear suavemente la base para desprender las burbujas que pudieran haberse formado. Sujetar la parte media del cuentagotas/triturador con el pulgar y el índice y, apartando la punta, presionar suavemente para triturar la ampolla. Invertir el cuentagotas y apretar suavemente para dispensar gota a gota.

**Procedimiento de análisis:**  
1. Dispensar 1 a 2 gotas de reactivo en una tira de papel de filtro Whatman (N° 1) (o equivalente).  
2. Con un asa o aguja de platino, o con una varilla aplicadora de madera, hacer un frotis en el papel de filtro saturado con un aislado de 18 a 24 horas.  
3. Observar el desarrollo de color al cabo de 10 a 30 segundos.

**INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS**  
Prueba Positiva: Aparición de un color violeta o púrpura antes de 10 a 30 segundos

Prueba Negativa: Reacción diferida o sin cambio de color en 10 a 30 segundos

**CONTROL DE CALIDAD**  
Todos los lotes de BactiDrop™ Oxidase se han estudiado usando los siguientes microorganismos de control de calidad, y los resultados son aceptables. El estudio de los microorganismos de control se debe realizar de acuerdo con los procedimientos de control de calidad establecidos en el laboratorio. Si se observan resultados anómalos en el control de calidad, no se informará de los resultados de ese paciente.

CONTROL	INCUBACIÓN	RESULTADOS
<i>Neisseria sicca</i> ATCC® 9913	Aerobiosis, 30 segundos a 25°C	Positivo
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC® 27853	Aerobiosis, 30 segundos a 25°C	Positivo
<i>Pasteurella multocida</i> ATCC® 43137	Aerobiosis, 30 segundos a 25°C	Positivo
<i>Escherichia coli</i> ATCC® 25922	Aerobiosis, 30 segundos a 25°C	Negativo

- LIMITACIONES<sup>5</sup>**
- Seleccionar para el estudio colonias que no se hayan cultivado en un medio selectivo o en un medio con glucosa, ya que los agentes selectivos y la fermentación pueden inhibir la actividad de la enzima oxidasa y dar resultados falsos negativos.
  - Los productores débiles de oxidasa, como *Pasteurella*, pueden aparecer negativos en los límites de tiempo de la prueba. Se deben repetir los resultados no compatibles con otras reacciones bioquímicas o con el microorganismo.
  - Pueden darse resultados falsos negativos si los cultivos mixtos contienen los dos géneros *Pseudomonas* y *Neisseria*. Las especies de *Pseudomonas* producen una sustancia inhibitoria que interfiere con la producción de oxidasa por las especies de *Neisseria*.
  - El reactivo oxidasa se autooxida rápidamente y pierde su sensibilidad. Los reactivos no utilizados deben desecharse al final de cada jornada.
  - La prueba de oxidasa es una reacción de oxidación; para obtener resultados óptimos, el oxígeno debe alcanzar las colonias.
  - Para la prueba de oxidasa se recomienda usar un asa o aguja de platino, o una varilla aplicadora de madera.<sup>6</sup> La presencia de restos de hierro (micromo) puede catalizar una reacción de oxidación y dar un resultado falso positivo.

- BIBLIOGRAFÍA**
- Kovacs, N. 1956. Nature. 178:703.
  - Cowan, S.T. and K.J. Steel. 1966. Manual for the Identification of Medical Bacteria. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
  - Steel, K.J. 1962. J. Appl. Bacteriol. 25:445-455.
  - Murray, P.R., E.J. Baron, J.H. Jorgensen, M.A. Pfaller, and R.H. Tenover. 2003. Manual of Clinical Microbiology, 8ª ed., Vol. 1. ASM, Washington, D.C.
  - MacFaddin, J.F. 2000. Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria, 3ª ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA.
  - Steel, K.J. 1961. J. Gen. Microbiol. 25:297-306.

**ENVASADO**  
BactiDrop™ Oxidase (0,75 ml/ampolla):  
REF 21540 ..... 50 ampollas/envase

Simbología	
REF	Número de catálogo
IVD	Dispositivo médico para diagnóstico <i>in vitro</i>
LAB	Para el uso del laboratorio
	Consulte las instrucciones de uso
	Límite de temperatura (Temp. de almacenamiento)
LOT	Código de lote (Número de lote)
	Fecha de caducidad
EC REP	Representante autorizado en Europa

**CE**  
BactiDrop™ es una marca comercial de Remel Inc.  
ATCC® es una marca registrada de American Type Culture Collection.  
CAS (N° del Chemical Abstracts Service Registry)

IFU 21540, Revisado el 2006-05-28 Impreso en los EE.UU.

12076 Santa Fe Drive, Lenexa, KS 66215, EE.UU.  
Información General: (800) 255-6730 Servicio Técnico: (800) 447-3641 Pedidos: (800) 447-3635  
Teléfono nacional/internacional: (913) 888-0939 Fax internacional: (913) 895-4128  
Internet: www.remel.com Correo electrónico: remel@remel.com

Figura 14. Prueba de la Oxidasa - BactiDrop™ Oxidase.

## ANEXO N°2

Tabla 8. Perfil de susceptibilidad de las cepas *Acinetobacter baumannii* - CLSI 2018.

N°	UNIDAD	TIPO DE MUESTRA	DETECCION FENOTIPICA	DETECCION GENOTIPICA	SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA (mm.) CLSI 2018																											
					AMK	I	ATM	I	CAZ	I	CIP	I	GEN	I	FEP	I	IPM	I	MEM	I	SXT	I	DOX	I	LVX	I	TOB	I	SAM	I		
1	IN	LP	+	OXA-24	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	12	R	6	R	14	R				
2	IN	BR	+	OXA-24	6	R	13	R	6	R	6	R	6	R	16	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	18	R				
3	EME	BR	+	OXA-24	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	8	R	11	R	6	R	13	R				
4	IN	TR	+	OXA-24	6	R	14	R	6	R	6	R	6	R	13	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	10	R				
5	EME	BR	+	OXA-24	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	13	R	6	R	6	R	8	R	13	R	6	R	14	R		
6	ICU	BR	+	OXA-24	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	11	R	6	R	6	R	8	R	12	R	6	R	9	R		
7	ICU	BR	+	OXA-24	10	R	13	R	6	R	6	R	6	R	14	R	6	R	6	R	6	R	15	S	12	R	6	R	12	R		
8	IN	BR	+	OXA-24	10	R	14	R	10	R	6	R	6	R	15	R	9	R	6	R	6	R	10	R	10	R	6	R	20	S		
9	EME	BR	+	OXA-24	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	8	R	8	R	6	R	14	R		
10	IN	HA	+	OXA-24	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	8	R	10	R	6	R	14	R		
11	IN	HA	+	Ausente	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	13	R	12	R	6	R	6	R	21	S	16	R	6	R	6	R		
12	OUT	CC	+	OXA-24	10	R	14	R	10	R	6	R	6	R	14	R	6	R	6	R	6	R	21	S	12	R	8	R	11	R		
13	EME	BR	+	OXA-24	10	R	13	R	10	R	6	R	6	R	15	R	11	R	6	R	6	R	21	S	13	R	6	R	13	R		
14	IN	LC	+	OXA-24	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	11	R	11	R	6	R	12	R		
15	IN	SA	+	OXA-24	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	12	R	6	R	6	R	6	R	10	R	6	R	13	R		
16	ICU	BR	+	OXA-24	10	R	14	R	8	R	6	R	6	R	17	R	6	R	6	R	6	R	12	R	10	R	6	R	16	S		
17	IN	BR	+	OXA-24	15	R	13	R	6	R	6	R	6	R	16	R	9	R	6	R	6	R	9	R	6	R	6	R	22	S		
18	IN	HA	+	Ausente	6	R	13	R	14	R	6	R	14	R	12	R	12	R	11	R	6	R	21	S	12	R	17	S	6	R		
19	ICU	CC	+	OXA-24	9	R	13	R	6	R	6	R	6	R	16	R	10	R	6	R	6	R	8	R	9	R	6	R	18	S		
20	ICU	BR	+	Ausente	6	R	13	R	6	R	6	R	6	R	14	R	6	R	12	R	6	R	6	R	6	R	6	R	19	S		
21	EME	BR	+	OXA-24	6	R	15	R	10	R	6	R	6	R	16	R	6	R	6	R	6	R	21	S	13	R	6	R	15	S		
22	IN	ES	+	OXA-24	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	8	R	12	R	6	R	12	R		
23	EME	BR	+	OXA-24	10	R	14	R	8	R	6	R	6	R	16	R	9	R	6	R	6	R	21	S	12	R	8	R	14	R		
24	IN	HA	+	OXA-24	10	R	12	R	6	R	6	R	6	R	14	R	6	R	6	R	6	R	6	R	10	R	6	R	13	R		
25	IN	HA	+	OXA-24	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	8	R	13	R	6	R	13	R		
26	IN	CC	+	OXA-24	8	R	14	R	9	R	6	R	6	R	15	R	8	R	6	R	6	R	15	S	12	R	8	R	11	R		
27	IN	CC	+	OXA-24	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	8	R	9	R	6	R	6	R	8	R	12	R	6	R	13	R		

Tabla 8. Perfil de susceptibilidad de las cepas *Acinetobacter baumannii* - CLSI 2018. Continuación.

N°	UNIDAD	TIPO DE MUESTRA	DETECCION FENOTIPICA	DETECCION GENOTIPICA	SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA (mm.) CLSI 2018																											
					AMK	I	ATM	I	CAZ	I	CIP	I	GEN	I	FEP	I	IPM	I	MEM	I	SXT	I	DOX	I	LVX	I	TOB	I	SAM	I		
28	IN	SA	+	Ausente	9	R	11	R	6	R	6	R	15	S	11	R	6	R	6	R	6	R	15	S	15	R	16	S	9	R		
29	ICU	CC	+	Ausente	6	R	14	R	14	R	6	R	13	R	14	R	10	R	8	R	6	R	21	S	11	R	16	S	14	R		
30	IN	BR	+	OXA-24	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	11	R	6	R	6	R	6	R	11	R	6	R	15	S		
31	ICU	BR	+	OXA-24	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	8	R	11	R	6	R	11	R		
32	EME	CC	+	Ausente	6	R	6	R	6	R	6	R	11	R	6	R	6	R	6	R	6	R	8	R	11	R	6	R	10	R		
33	IN	CC	+	OXA-24	9	R	14	R	6	R	6	R	10	R	16	R	10	R	6	R	6	R	8	R	10	R	6	R	21	S		
34	EME	SA	+	Ausente	19	S	15	R	6	R	6	R	13	R	16	R	11	R	6	R	6	R	11	R	10	R	19	S	17	S		
35	EME	BR	+	Ausente	9	R	6	R	6	R	6	R	12	R	11	R	6	R	6	R	6	R	8	R	12	R	6	R	17	S		
36	EME	BR	+	Ausente	10	R	8	R	6	R	6	R	11	R	10	R	9	R	6	R	6	R	15	S	11	R	6	R	16	S		
37	OUT	BR	+	Ausente	9	R	9	R	6	R	6	R	11	R	8	R	9	R	6	R	6	R	20	S	12	R	6	R	16	S		
38	IN	CC	+	Ausente	11	R	6	R	6	R	6	R	13	R	12	R	6	R	6	R	6	R	8	R	12	R	6	R	17	S		
39	EME	SA	+	Ausente	9	R	9	R	6	R	6	R	11	R	11	R	6	R	6	R	6	R	8	R	11	R	6	R	16	S		
40	EME	BR	+	OXA-24	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	10	R	12	R	6	R	10	R		
41	ICU	TR	+	Ausente	9	R	6	R	6	R	6	R	13	R	11	R	6	R	6	R	6	R	22	S	14	R	6	R	16	S		
42	ICU	BR	+	OXA-24	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	10	R	6	R	13	R		
43	OUT	BR	+	OXA-58, OXA-24	10	R	9	R	6	R	6	R	12	R	12	R	9	R	9	R	9	R	21	S	13	R	6	R	14	R		
44	EME	BR	+	OXA-58, OXA-24	9	R	6	R	6	R	6	R	11	R	7	R	6	R	6	R	6	R	14	S	6	R	6	R	15	S		
45	IN	HA	+	OXA-24	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	8	R	11	R	6	R	14	R		
46	IN	BR	+	OXA-24	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	9	R	11	R	6	R	6	R	6	R	11	R	6	R	12	R		
47	IN	ES	+	OXA-58, OXA-24	8	R	10	R	12	R	6	R	13	R	6	R	6	R	6	R	6	R	14	S	6	R	17	S	6	R		
48	IN	BR	+	OXA-24	6	R	6	R	6	R	6	R	6	R	8	R	11	R	6	R	6	R	6	R	11	R	6	R	9	R		
49	EME	BR	+	OXA-58, OXA-24	9	R	6	R	6	R	6	R	11	R	10	R	8	R	8	R	6	R	15	S	12	R	6	R	16	S		
50	IN	LP	+	OXA-58, OXA-24	12	R	11	R	7	R	6	R	18	S	13	R	11	R	6	R	6	R	16	S	15	R	20	S	9	R		
51	IN	BR	+	OXA-24	8	R	13	R	6	R	6	R	6	R	14	R	6	R	6	R	6	R	8	R	10	R	6	R	6	R		

- **Unidad:** EME: Emergencia; ICU: Unidad de cuidados intensivos; IN: Hospitalización; OUT: Consulta externa.
- **Tipo de muestra:** BR: Bronquial; CC: Punta de Catéter central; LC: Líquido cefalorraquídeo; ES: Espudo; HA: Herida; LP: Líquido pleural; SA: Sangre; TR: Traqueal.
- **Antibióticos:** AMK: Amikacina; ATM: Aztreonam; CAZ: Ceftazidima; CIP: Ciprofloxacino; GEN: Gentamicina; FEP: Cefepime; IPM: Imipenem; MEM: Meropenem; LVX: Levofloxacino; TOB: Tobramicina; SAM: Ampicilina-Sulbactam; SXT: Sulfametoxazol-trimetoprima; DOX: Doxiciclina
- **I: Interpretación:** S: Sensible, R: Resistente.

## ANEXO N°3

### GF-1 Bacterial DNA Extraction Kit

The **GF-1 Bacterial DNA Extraction Kit** is designed for rapid and efficient purification up to 20µg of a high molecular weight genomic DNA from either Gram-negative or Gram –positive bacteria. This kit uses a specially-treated glass filter membrane fixed into a column to efficiently bind DNA in the presence of high salt. This kit applies the principle of a mini- column spin technology and the use of optimized buffers to ensure that only DNA is isolated while cellular proteins, metabolites, salts and other low molecular weight impurities are removed during the subsequent washing steps. High-purity genomic DNA is eluted in water or low salt buffers and has a  $A_{260/280}$  ratio between 1.7 and 1.9 making it ready-to-use in many routine molecular biology applications such as restriction enzyme digestion, Southern blotting, PCR, DNA fingerprinting and other manipulations.

#### Kit component

Product Catalog No.	5 Preps SAMPLE	50 Preps GF-BA-050	100 Preps GF-BA-100
<b>Components</b>			
GF-1 columns	5	50	100
Collection tubes	5	50	100
Resuspension Buffer 1 ( <b>Buffer R1</b> )	1ml	8ml	15ml
Resuspension Buffer 2 ( <b>Buffer R2</b> )	1.5ml	12ml	24ml
Bacterial Genomic Binding Buffer ( <b>Buffer BG</b> )	4ml	28ml	56ml
Wash Buffer	2.4ml	17ml	34ml
Elution Buffer	1.5ml	10ml	20ml
Proteinase K*	0.11ml	1.05ml	2 x 1.05ml
Handbook	1	1	1

\* Please refer to **Reconstitution of Solutions** and **Storage and Stability** before using this kit.

The **GF-1 Bacterial DNA Extraction Kit** is available as 50 and 100 purifications per kit. The reagents and materials provided with the kit are for research purposes only

.Note: The **GF-1 Bacterial DNA Extraction Kit** is optimized to isolate up to 20µg of DNA on recommended cell culture volume. Bacteria cultures vary in the number of cells depending on the strain, growth conditions and viability of the cells. When processing samples, do not use more than

the recommended starting volume as it will lead to excessive number of cells and overloading of the column. This would result on reduced yield and purity. The recommended cell culture volume is between 1 to 3ml for both Gram-negative and Gram-positive bacteria to ensure yield and purity is obtained.

### **Additional Materials to be Supplied by User**

Absolute Ethanol (>95%)

Lysozyme (50mg/ml)

RNase A (DNase-free) (20mg/ml)

### **Reconstitution of Solutions**

The bottle labeled **Wash Buffer** contains concentrated buffer which must be diluted with absolute ethanol (>95%) before use.

For **SAMPLE (5 preps)**,

Add **5.6ml** of absolute ethanol into the bottle labeled **Wash Buffer**.

For **GF-BA-050 (50 preps)**,

Add **40ml** of absolute ethanol into the bottle labeled **Wash Buffer**.

For **GF-BA-100 (100 preps)**,

Add **80ml** of absolute ethanol into one of the bottles labeled

**Wash Buffer**. Store **Wash Buffer** at room temperature with

bottle capped tight after use.

### **Storage and Stability**

Store solutions at 20°C – 30°C.

**Proteinase K** is stable for up to 1 year after delivery when stored at room temperature or 4°C. To prolong the lifetime of Proteinase K, storage at -20°C is recommended.

Kit components are guaranteed to be stable for 18 months from the date of manufacture **Buffer BG** may exhibit salt precipitation due to cold temperature. If this occurs, simply warm the bottle at 55°C - 65°C with occasional mixing until precipitate is completely dissolved.

### **Chemical Hazard**

**Buffer BG** contains guanidine salts which can be harmful when in contact with skin or swallowed. Always wear gloves and practice standard safety precautions. Do NOT disinfect guanidine or extraction waste in solutions containing bleach or any other form of acid. To clean any items contaminated with the reagent, simply soak

in detergent and water to remove all traces of guanidine before cleaning with bleach or acidic solutions.

## Procedures

### Reminder

- All steps are to be carried out at room temperature unless stated otherwise.
- **Wash Buffer** (concentrate) has to be diluted with absolute ethanol before use. Please refer to **Reconstitution of Solutions**.
- If precipitation forms in **Buffer BG**, incubate at 55°C - 65°C with occasional mixing until completely dissolved.

Pre-set waterbath to 37°C and the second waterbath to 65°C. Pre-heat **Elution Buffer** to 65°C (optional).

#### 1. Centrifugation

Pellet 1 - 3ml of bacteria culture grown overnight or culture grown to log phase by centrifugation at 6,000 x g for 2 min at room temperature. Decant the supernatant completely.

#### 2. Resuspension of pellet

Add 100µl **Buffer R1** to the pellet and resuspend the cells completely by pipetting up and down.

*Ensure complete cell resuspension. Lysis will not occur if clumps of bacteria remain following an inefficient resuspension procedure.*

#### 3. Lysozyme treatment

For Gram-negative bacteria strains, add 10µl lysozyme (50mg/ml) into the cell suspension. For Gram-positive bacteria strains, add 20µl lysozyme (50mg/ml) into the cell suspension. Mix thoroughly and incubate at 37°C for 20 min.

#### 4. Centrifugation

Pellet digested cells by centrifugation at 10,000 x g for 3 min. Decant the supernatant completely.

#### 5. Protein denaturation

Resuspend pellet in 180 µl of **Buffer R2** and add 20 µl of **Proteinase K**. Mix thoroughly. Incubate at 65°C for 20 min in a shaking waterbath or with occasional mixing every 5 min. *Lysate should be clear at the end of incubation or else extend the incubation time to 30 min.*

### **Optional: Removal of RNA**

If RNA-free DNA is required, add 20 µl of RNase A (DNase-free, 20mg/ml).

Mix and incubate at 37°C for 5 min.

*Residual RNA fragments will be removed during column washing.*

### **6. Homogenization**

Add 2 volumes (~400 µl without RNase A treatment, ~440 µl with RNase A treatment) of **Buffer BG** and mix thoroughly by inverting tube several times until a homogeneous solution is obtained. Incubate for 10 min at 65°C.

### **7. Addition of Ethanol**

Add 200 µl of absolute ethanol. Mix immediately and thoroughly.

*Mix immediately to prevent uneven precipitation of nucleic acid due to high local ethanol concentrations.*

### **8. Loading to column**

Transfer the sample (max.650µl) into a column assembled in a clean collection tube (provided). Centrifuge at 10,000 x g for 1 min. Discard flow through.

*If column clogs, add 200µl Buffer BG into column and centrifuged as above.*

### **9. Column washing**

Wash the column with 650 µl of **Wash Buffer** and centrifuge at 10,000 x g for 1 min. Discard flow through.

*Ensure that ethanol has been added into the Wash Buffer before use (refer to Reconstitution of Solutions).*

### **10. Column drying**

Centrifuge the column at 10,000 x g for 1 min to remove residual ethanol.

*This step has to be carried out to remove all traces of ethanol as residual ethanol can affect the quality of DNA and may subsequently inhibit enzymatic reactions.*

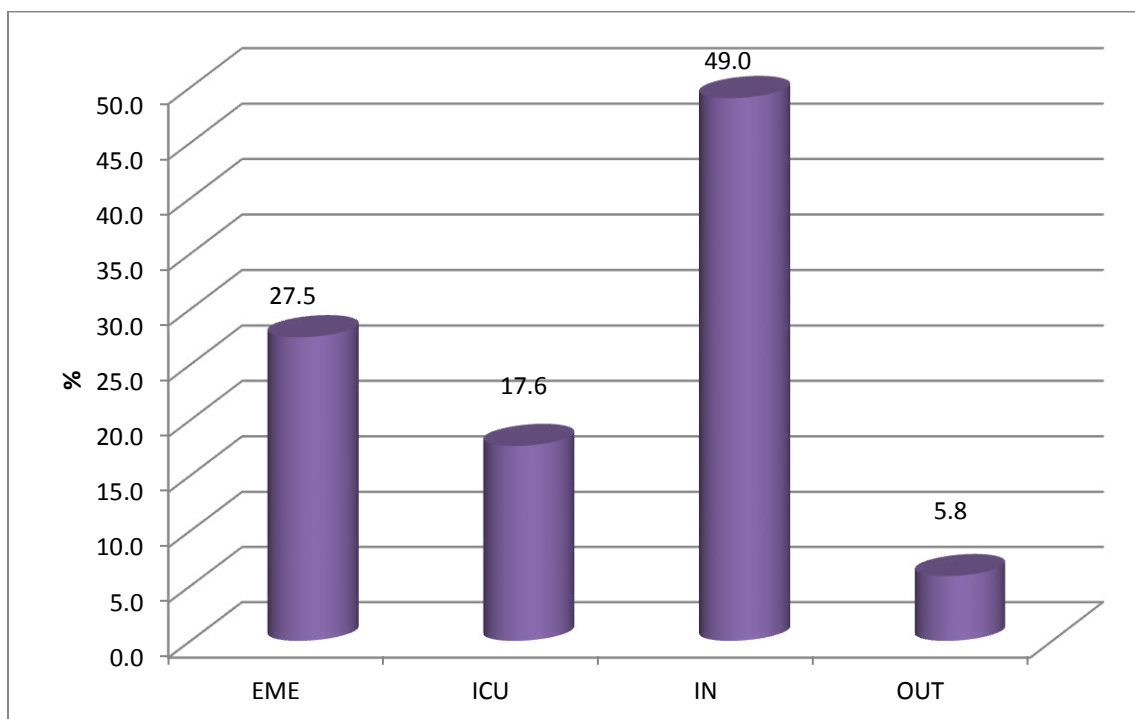
### **11. DNA elution**

Place the column into a clean microcentrifuge tube. Add 50 - 100 µl of preheated **Elution Buffer**, TE buffer or sterile water directly onto column membrane and stand for 2 min. Centrifuge at 10,000x g for 1 min to elute DNA. Store DNA at 4°C or -20°C.

## ANEXO N°4

### Origen de las cepas recolectadas

Las cepas aisladas resistentes a carbapenémicos se obtuvieron de las siguientes áreas: Emergencia 14 (27.45%), UCI 9 (17.6 %), Hospitalización 25 (49.01 %) y de consulta externa 3 (5.8 %).

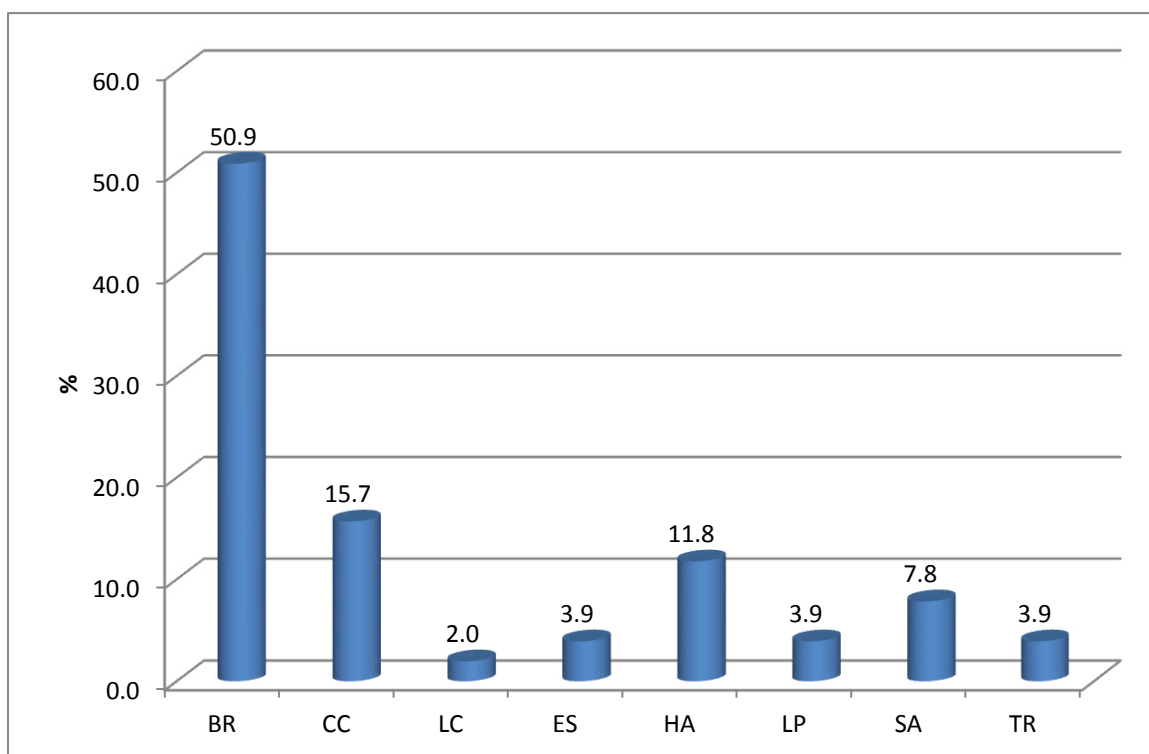


**EME:** Emergencia; **ICU:** Unidad de cuidados intensivos; **IN:** Hospitalización;  
**OUT:** Consulta externa.

Figura 15. Distribución porcentual de las 51 cepas recolectadas de *Acinetobacter baumannii* según áreas del Hospital Nacional de Referencia.



El origen clínico de las 51 cepas de *Acinetobacter baumannii* recolectadas fueron en su mayoría muestras bronquiales 26 (50.9.1%), Punta de Catéter central 8 (15.7%), Herida 6 (11.8%), Sangre 4 (7.8%), traqueal 2 (3.9%), Esputo 2 (3.9%), Líquido pleural 2 (3.9%) y Líquido cefalorraquídeo 1 (2.0%). (Ver figura 15).



**BR:** Bronquial; **CC:** Punta de Catéter central; **LC:** Líquido cefalorraquídeo; **ES:** Esputo; **HA:** Herida; **LP:** Líquido pleural; **SA:** Sangre; **TR:** Traqueal.

Figura 16. Distribución porcentual de las 51 cepas recolectadas de *Acinetobacter baumannii* según tipo de muestra.